

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE MEDICINA
CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO CLÍNICO

ESTANDARIZACIÓN DE UNA REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA MULTIPLEX PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SIETE
ESPECIES DE IMPORTANCIA CLÍNICA DE *Candida*.

Autor

Christian Alejandro Rosales Ríos

DIRECTOR

Dr. Santiago Escalante Vanoni

QUITO, 2019

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Christian Alejandro Rosales Ríos, C.I 1724018096; autor del trabajo de graduación titulado: “Estandarización de una reacción en cadena de la polimerasa multiplex para la identificación de siete especies de importancia clínica de *Candida*”, previo a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICO CLÍNICO en la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



Christian Rosales Ríos

CI: 1724018096

DEDICATORIA

A todas las personas que día a día me motivan a seguir adelante

A mis padres, hermana y amigos

¡Y a todos los que pusieron su granito de arena para que esto sea posible!

“Siembra para cosechar, cuando el tiempo es bueno”

Guanaco MC

AGRADECIMIENTO

A la PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR, en especial a la Carrera de Bioquímica Clínica y a todos los profesores y personal que labora día a día por mejorarla.

Al laboratorio de Investigación de la Carrera de Bioquímica Clínica, particularmente al Mtr. Andrés Zabala, por los consejos, aprendizajes, risas, guía y amistad que me ofreció durante la realización del trabajo práctico en dicho lugar.

A todas las personas que colaboraron en el desarrollo de este proyecto, en especial a Dayana Yáñez por sus ganas de aprender lo poco que les pude enseñar dentro del laboratorio y todas las ganas con las que día a día me ayudaban.

Al Doctor Santiago Escalante, por sus consejos, paciencia y confianza que depositó en mí durante todo este tiempo, para el desarrollo de la tesis y otras actividades; todo lo aprendido perdurará en mí para toda la vida.

A mi familia, amigas y amigos, por estar conmigo durante tantos años y sobre todo por nunca dejar de apoyarme en los momentos más difíciles donde necesitaba luz para seguir inevitablemente por el camino correcto.

Christian Rosales R.

RESUMEN

Introducción: la identificación de las especies de *Candida* ha ido evolucionando con el pasar del tiempo. El cultivo micológico es el primer paso para obtener las colonias aisladas, se lo realiza en agar Sabouraud; la prueba más utilizada es el tubo germinal, técnica que permite diferenciar las especies de *Candida albicans* de las *no albicans*, es un método rápido para observar el desarrollo de hifas; dicha metodología agrupa a todas las especies diferentes a *Candida albicans* en el grupo de *no albicans* lo que deja una gran vacía de información acerca de la determinación de la especie de esta levadura. Actualmente, las técnicas se han adaptado a las necesidades de los laboratorios por lo que se han desarrollado pruebas bioquímicas como el auxonograma y zimograma, así como agares cromogénicos que diferencian a las especies de *Candida* por colores. Por lo que, el objetivo de este estudio es desarrollar y estandarizar una técnica de reacción en cadena de la polimerasa multiplex para la identificación de siete especies de importancia clínica de *Candida*.

Metodología: en el presente estudio se emplearon cepas estandarizadas de siete diferentes especies de *Candida albicans*, *auris*, *glabrata*, *guilliermondii*, *krusei*, *parapsilosis* y *tropicalis*; las cuales fueron cultivadas y su ADN obtenido mediante extracción por columna. Se realizó gradientes de temperatura y concentración de *primers* para la estandarización de la PCR multiplex que amplificó el gen ITS 1 para las especies *albicans*, *glabrata*, *guilliermondii*, *krusei* y *tropicalis*, el gen Topoisomerasa II de la especie *auris* y la región 5.8s ADN de la especie *parapsilosis*. Se realizaron diluciones de ADN para determinar el límite de detección y se comparó la especificidad de *primers* mediante pruebas con varios ADN de diferentes especies de levaduras.

Resultados: se estandarizó la técnica de PCR multiplex con las siguientes condiciones de termociclado: 10 minutos de denaturación inicial a 94° C, 30 ciclos que constan de denaturación a 94 por 30 segundos, hibridación a 57° C por 30 segundos y elongación a 74° C por 30 segundos, seguido de una elongación final por 10 minutos a 74° C.

Conclusiones: se determinó por diluciones que la extracción de ADN sin el uso de liticasa era posible utilizando un método de extracción por columna. En cuanto al protocolo de trabajo, se prepararon dos reacciones para facilitar la identificación de las especies; la concentración de *primers* en la MasterMix se estableció en 0,2 uM. Por consiguiente, se

estableció que la técnica de PCR multiplex determinaba correctamente las siete especies de *Candida* permitiendo un diagnóstico rápido y eficaz del microorganismo deseado. El límite de detección de la prueba al ser de 0.032 ng/uL indicó que la técnica puede ser aplicable aun cuando existan niveles extremadamente bajos de ADN del microorganismo en la muestra.

Palabras clave: Estandarización, *Candida*, especies, PCR multiplex.

ABSTRACT

Introduction: The identification of *Candida* species has evolved over time. A basic test for its identification is a culture on Sabouraud agar, and its microscopic observation; the most used test is called germinal tube, a technique that allows to differentiate species of *Candida albicans* from the non-*albicans*, it is a quick test to observe the development of pseudo-hyphae; this test groups all the different species to *Candida albicans* in the non-*albicans* groups, which leaves a large information gap about the determination of species of this yeast. Currently, the techniques have been adapted to the needs of laboratories for which biochemical test have been developed such as auxonogram and zymogram; as well as chromogenic agars that facilitate the identification of *Candida* species by color. Therefore, the objective of this study is to develop and standardize a Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) technique for the identification of seven species of *Candida*.

Materials and Methods: In the present study, standardized strains of seven different species of *Candida*: *albicans*, *auris*, *glabrata*, *guilliermondii*, *krusei*, *parapsilosis*, *tropicalis*, were used; which were cultivated and their DNA were obtained by extraction by column. Temperature and concentration gradients of *primers* were performed for the standardization of the multiplex PCR that amplified the ITS2 gene for the *albicans*, *glabrata*, *guilliermondii*, *krusei* and *tropicalis* species, the TopoIsomerase II gene of *auris* specie and the 5.8s DNA of *parapsilosis* specie. DNA dilutions were made to determine the limit of detection and the specificity of *primers* was compared by test with several DNA's of different yeast species.

Results: The Multiplex PCR technique was standardized with the following thermocycling conditions: 10 minutes of initial denaturation at 94 °C, 30 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 30 seconds, hybridization at 57 °C for 30 seconds and elongation at 74 °C for 30 seconds, followed by a final elongation at 74 °C for 10 minutes. In addition, the concentration of *primers* in the MasterMix was set to 0,2 µM for optimum performance without residues. It was determined by dilutions that the limit of detection of the technique was 0,032 ng/uL.

Conclusions: It was determined that DNA extraction without the use of Lyticase was possible using a column extraction method. Therefore, it was established that the Multiplex

PCR technique correctly identified the seven *Candida* species allowing a rapid and efficient diagnosis of the desired microorganism. The limit of detection of the technique at 0.032 ng/uL indicated that the technique may be applicable even when there are extremely low levels of DNA of the microorganism in the sample.

Keywords: Standardization, *Candida*, species, Multiplex PCR

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTO.....	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	VI
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ANEXOS	XII
LISTA DE SIGLAS	XIV
CAPÍTULO I.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3 OBJETIVOS.....	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos:	4
1.4 Limitación del estudio	5
CAPÍTULO II.....	5
2.1 ANTECEDENTES	5
2.2 MARCO TEÓRICO	9
2.2.1 Características generales de la levadura <i>Candida</i>	9
2.2.1.1 <i>Candida albicans</i> :	10
2.2.1.2 <i>Candida auris</i> :.....	10
2.2.1.3 <i>Candida glabrata</i> :	11
2.2.1.4 <i>Candida guilliermondii</i> :	11
2.2.1.5 <i>Candida krusei</i> :	11
2.2.1.6 <i>Candida parapsilosis</i> :	12

2.2.1.7 <i>Candida tropicalis</i> :	12
2.2.2 Prevalencia de las especies de <i>Candida</i> en el país	12
2.2.3 Factores de virulencia	13
2.2.3.1 Dimorfismo	13
2.2.3.2 Fosfolipasas	13
2.2.3.3 Proteasas	13
2.2.4 Infecciones en pacientes vulnerables	14
2.2.5 Tratamiento	14
2.2.6 Identificación fenotípica de especies de <i>Candida</i> .	14
2.2.6.1 Prueba del tubo germinal	15
2.2.6.2 Auxonograma	15
2.2.6.3 Zimograma	16
2.2.6.4 Agares cromogénicos	16
2.2.7 Métodos de identificación molecular para <i>Candida</i>	17
2.3 MARCO CONCEPTUAL	18
CAPÍTULO III	21
3.1 MARCO METODOLÓGICO	21
3.1.1 Tipo de estudio	21
3.2 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	22
3.3 MATERIALES y PROCEDIMIENTOS	24
3.3.1 Materiales utilizados	24
3.4 FASES METODOLÓGICAS	26
3.4.1 Fase I. Aprobación del proyecto de investigación	26
3.4.2 Fase II. Procedimiento de laboratorio	27
3.4.2.1 Diseño de <i>primers</i>	27
3.4.2.2 Cultivo de las diferentes levaduras del género <i>Candida</i> .	28

3.4.2.3 Extracción de ADN de <i>Candida</i>	28
3.4.2.4 Preparación de la Master Mix y concentración de <i>primers</i>	29
3.4.2.5 Determinación de las condiciones adecuadas de trabajo	30
3.4.2.6 Ensayos para el límite de detección	34
3.4.2.7 Ensayos para determinación de especificidad	36
3.5 CONTROL DE CALIDAD.....	36
3.6 ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	36
CAPÍTULO IV	37
4.1 RESULTADOS	37
4.1.1 Resultados del cultivo de las levaduras	37
4.1.2 Resultados de extracción de ADN.	38
4.1.3 Resultados de pruebas moleculares	40
4.1.3.1 Estandarización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Multiplex.	40
4.1.3.2 Resultados de especificidad de primers	44
4.1.3.3 Resultados de límite de detección	45
4.1.3.4 Algoritmo de trabajo para la PCR multiplex.....	48
CAPÍTULO V	50
5.1 DISCUSIÓN.....	50
5.2 CONCLUSIONES.....	53
5.3 RECOMENDACIONES	54
BIBLIOGRAFÍA:	56
ANEXOS	61

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Número de cepas de <i>Candida</i> estudiadas en el periodo 2007-2016 junto con sus características.....	8
Tabla 2: Distribución de aislados clínicos de <i>Candida</i> en Colombia, diferentes hospitales..	9
Tabla 3: Operacionalización de las variables	22
Tabla 4: Cepas de referencia (ATCC) utilizadas en este estudio.	26
Tabla 5 Secuencias de primers utilizadas para la identificación de las siete especies de <i>Candida</i>	28
Tabla 6: Determinación de la concentración de primers en la Master Mix.....	29
Tabla 7 Preparación de la MasterMix para la estandarización de cada especie.	30
Tabla 8: Programa de termociclado para la identificación de especies de <i>Candida</i> , utilizando una denaturación inicial de 10 minutos a 94°C.	31
Tabla 9: Preparación de la primera Master Mix para la PCR multiplex: <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> y <i>C. tropicalis</i>	33
Tabla 10: Preparación de la segunda Master mix para la PCR multiplex: <i>C. auris</i> , <i>C. guilliermondii</i> y <i>C. parapsilosis</i>	33
Tabla 11: Diluciones del ADN obtenido de las siete especies de <i>Candida</i>	35
Tabla 12: Características macroscópicas de <i>Candida albicans</i>	37
Tabla 13: Concentraciones de ADN cuantificadas en NanoDrop mediante las 4 diferentes técnicas de extracción.	38
Tabla 14: Relación 260/280 de las muestras de ADN cuantificadas en NanoDrop mediante las 4 diferentes técnicas de extracción de ADN.	39
Tabla 15: Programa de termociclado para la estandarización de la PCR multiplex.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Prueba de tubo germinal para <i>Candida albicans</i> , observada microscópicamente con lente de 40x.	10
Figura 2: Auxonograma empleado para la identificación de levaduras del género <i>Candida</i>	15
Figura 3: Agar cromogénico utilizado para identificar especies de <i>Candida</i>	16
Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa para la identificación de especies de <i>Candida</i>	17
Figura 5: Esquema del ITS 1 y 2 de <i>Candida</i> y su relación con los <i>primers</i> especie específico.	27
Figura 6: Colonias macroscópicas de <i>Candida albicans</i> en agar Sabouraud.	37
Figura 7: Coloración Gram en la que se observa una gran cantidad de levaduras con forma ovoide correspondientes a <i>Candida auris</i>	38
Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa al 2% por 90 minutos a 80 Voltios de muestras de 7 especies de <i>Candida</i> extraídas por 4 diferentes métodos.	40
Figura 9 Gel de agarosa de los gradientes de temperatura utilizados para la identificación de las siete especies de <i>Candida</i>	42
Figura 10: PCR multiplex.	43
Figura 11: Determinación de la especificidad de cada par de <i>primers</i>	44
Figura 12: Determinación del Límite de detección para cada especie.	46
Figura 13: Representación de la última dilución detectable mediante la técnica de PCR Multiplex.	47
Figura 14: Algoritmo de Trabajo para la PCR Multiplex de <i>Candida</i>	49

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Protocolo para resuspender las cepas ATCC	61
Anexo 2: Protocolo de extracción de ADN mediante el kit comercial Roche	62
Anexo 3: Protocolo de extracción de ADN mediante el método casero de choque térmico	64
Anexo 4: Protocolo de extracción de ADN mediante el método casero de ebullición	65
Anexo 5: Protocolo de extracción de ADN mediante el kit comercial PureLink DNA Mini kit de Invitrogen	66
Anexo 6: Cuantificaciones de ADN mediante NanoDrop 2000	68
Anexo 7: Protocolo de trabajo para la elaboración del gel de electroforesis al 2%	72
Anexo 8: Protocolo de trabajo para la corrida de electroforesis.	73

LISTA DE SIGLAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

m-PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa multiplex

pb: Pares de bases

PF: Primer Forward

PR: Primer Reverse

Taq: Polimerasa *Thermus aquaticus*

Tm: Temperatura de fusión.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad la identificación de las especies de *Candida* se realiza en su mayoría por métodos fenotípicos como el tubo germinal, pruebas bioquímicas como el auxonograma, zimograma o agares cromogénicos y mediante el uso de equipos automatizados como los sistemas Vitek y Phoenix; sin embargo, se ha demostrado que estos métodos pueden presentar errores debido a que requieren de dos etapas en su identificación las cuales son el aislamiento de la colonia pura y la incubación por 24 horas. La mayoría de problemas en la identificación de las especies de *Candida* se produce en infecciones causadas por varias de sus especies, cuya caracterización necesita de una alta capacidad técnica por parte del profesional de la salud para el cultivo y el aislamiento del microorganismo en colonia pura, que se usará en su posterior identificación. (Kothavade, Kura, Valand, & Panthaki, 2010)

El estudio realizado por Ferrera en el 2014, compara dos métodos automatizados para identificación de especies de *Candida* y logra caracterizar el 100% de *Candida albicans* con el sistema Vitek mientras que el sistema MicroScan identificó erróneamente a una cepa como *Candida albicans*. En cuanto a *Candida tropicalis* el sistema Vitek identificó correctamente a un 77% de las cepas analizadas y MicroScan obtuvo un 82% de identificación en esta especie; con *Candida krusei* ambos equipos obtuvieron el 58% de sensibilidad para determinar correctamente esta especie (Ferrera & Reviakina, 2014).

De acuerdo a estos resultados, se evidencia que aún existen identificaciones erróneas por parte de los sistemas automatizados, en especial para levaduras del grupo no *albicans*, por lo tanto, es necesario estandarizar una técnica que facilite y mejore la identificación de especies de *Candida* y que de la misma manera sea capaz de disminuir el tiempo de respuesta del laboratorio hacia el médico, debido a que una identificación fenotípica manual o automatizada, requiere de 24 horas para el aislamiento de la colonia pura y posteriormente otras 24 horas para la identificación de la especie, en especial en pruebas fenotípicas de asimilación de azúcares como el auxonograma; por otro lado la metodología

molecular de PCR puede llegar a tardar entre 5-7 horas desde la recepción de la muestra y la posterior extracción de ADN, amplificación y revelación en gel de agarosa.

Las técnicas moleculares de amplificación han ganado importancia en los últimos años, esto gracias a su alta sensibilidad y especificidad, debido a que utilizan *primers* específicos (fragmentos de ADN dirigidos contra secuencias específicas para cada microorganismo). Entre las técnicas moleculares se encuentran la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que serán amplificados en un termociclador en unas condiciones previamente establecidas. Entre las técnicas moleculares está la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y su variante multiplex, cuya ventaja es que no requiere de un cultivo netamente puro, porque la técnica permite la identificación de varias especies mediante una sola reacción, mientras que los métodos fenotípicos manuales o automatizados requieren aislar una cepa pura, y si esta condición no se cumple dichos métodos muestran una baja sensibilidad, por lo tanto dependen en gran medida de la experiencia y capacidad del personal de laboratorio para obtener un adecuado aislado previo a la identificación de la especie.

La estandarización de la técnica PCR múltiplex para identificación de especies de *Candida* beneficiará al personal que trabaja en laboratorios micológicos en nuestro país y específicamente al Laboratorio de Investigación de la Carrera de Bioquímica Clínica de la PUCE, al tener una nueva opción mejorada para establecer con mayor precisión el microorganismo causante de la infección y poder aplicar la técnica en otras investigaciones.

En el futuro, el uso de esta técnica y su validación permitirá la implementación en los laboratorios de diagnóstico, que dispondrán de una técnica moderna que mejora la atención al paciente, al disminuir el tiempo de respuesta, que es mucho menor al que se consigue con las técnicas de fenotipificación de rutina; da una opción más al médico, quien dispondrá de una herramienta adicional en la que apoyarse para el diagnóstico preciso y oportuno y evitar complicaciones e infecciones sobreañadidas en el paciente.

1.2 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad es oportuno realizar una combinación de análisis clínicos y microbiológicos con el fin de llegar a un diagnóstico certero de una infección por *Candida albicans*. La evaluación del cuadro clínico a cargo del médico es la parte más importante del diagnóstico; sin embargo, este puede ser complementado con pruebas de laboratorio como una herramienta de apoyo que facilita la toma de decisiones por parte del personal de salud. El tratamiento de las infecciones micóticas se lo realiza dependiendo de la sintomatología del paciente, sin identificar el agente causal de la patología; esto, junto con el limitado uso de las pruebas de laboratorio para la identificación de la especie de *Candida* causante de la infección, puede ser un factor importante para que el paciente presente complicaciones en su tratamiento, como resistencia a los antimicóticos por parte del microorganismo. (Theill et al., 2016)

Los problemas en la identificación de especies de *Candida* todavía persisten debido a fallas en los métodos de identificación tanto fenotípico como cromogénico, ya que este tipo de agares solo son capaces de determinar a cuatro especies de importancia clínica de *Candida*. En un estudio realizado por Ballesté en el 2005 se determinó la sensibilidad del agar cromogénico para la identificación de especies de *Candida*; arrojando resultados de 88% para *Candida albicans* y 100% para *Candida krusei*. (Ballesté et al., 2005)

Las técnicas moleculares han ganado importancia en los últimos años debido a que disminuyen el tiempo de respuesta en el diagnóstico del microorganismo comparados con las metodologías manuales o automatizadas que pueden tardar hasta un día para presentar resultados; además se reduce el gasto en tratamientos para el paciente ya que una vez identificada la especie de *Candida* se le administra un tratamiento adecuado, evitando de la misma manera complicaciones a futuro.

En un estudio realizado en México se comparó tres metodologías para la identificación de especies de *Candida*, estas fueron: agar cromogénico, auxonograma y PCR. Como resultados se observaron que para el método de identificación de azúcares se requería un cultivo puro para evitar falsos diagnósticos, para el agar cromogénico se determinó una

sensibilidad del 100% para *Candida albicans*; pero, se observaron falsos positivos para *Candida tropicalis* y *krusei* debido a que existieron discrepancias al no poderse determinar un color característico de estas especies al desarrollarse sobre este medio cromogénico. (Estrada-barraza, Dávalos, Flores-padilla, Elias, & Octavio, 2011)

Ante los puntos antes expuestos este estudio propone la estandarización de una técnica de biología molecular para la identificación de siete especies de importancia clínica de *Candida* con la finalidad de facilitar el diagnóstico, mejorar el tiempo de respuesta y disminuir las identificaciones erróneas causadas por las metodologías manuales basadas en características fenotípicas.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Estandarizar una Reacción en Cadena de la Polimerasa Multiplex para la identificación de siete especies de *Candida* de importancia clínica.

1.3.2 Objetivos específicos:

- Establecer el mejor método de extracción de ADN en cepas de *Candida*, sin el uso de la enzima Liticasa.
- Establecer las condiciones adecuadas de la técnica de PCR multiplex: temperaturas de trabajo de cada fase del ciclo de PCR, concentración de reactivos, tiempo y número de ciclos para identificar las especies de *Candida*.
- Determinar la especificidad de cada par de *primers* para la identificación de las especies de *Candida* por PCR multiplex
- Determinar el límite de detección de la PCR multiplex frente a las diferentes especies de *Candida*.

1.4 Limitación del estudio

Este estudio está limitado únicamente a la identificación de siete cepas de importancia clínica de *Candida* mediante PCR multiplex. En el presente estudio no se realizará una identificación de otro género de levaduras ni de determinadas especies de *Candida*.

Las condiciones de trabajo fueron determinadas con cepas puras; por lo que el desempeño de la PCR deberá ser evaluado posteriormente frente a las diferentes matrices biológicas que se puedan tener en el laboratorio.

CAPÍTULO II

2.1 ANTECEDENTES

Candida es un microorganismo polimórfico, que presenta características de levaduras como las pseudohifas, factor importante de virulencia en las infecciones provocadas por este microorganismo. La especie más importante dentro de este género es *Candida albicans*; este microorganismo forma parte de la microbiota del ser humano, alojándose en la cavidad oral, tracto gastrointestinal y mucosa vaginal del aparato reproductor femenino; sin embargo, es considerado un patógeno oportunista principalmente en casos de infecciones vaginales debido a que un cambio en el pH normal puede causar un desequilibrio de la microbiota normal, lo que puede favorecer a la proliferación de esta levadura y posteriormente provocar una infección (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2014). El tratamiento empírico de estas infecciones se ha centrado en las bacterias, manteniendo a las levaduras en un segundo plano como agentes causales, disminuyendo el uso de pruebas complementarias para la identificación de especies de levaduras debido a su costo o su tiempo de realización (Ferrara & Reviakina, 2014).

El desarrollo de este microorganismo se produce en el estado temprano de la infección; mediante la producción de lisozimas y lipasas, enzimas que degradan los componentes celulares facilitando la infiltración tisular de la levadura. Estos microorganismos al no ser identificados correctamente pueden persistir en el interior de los tejidos a pesar de que la paciente haya recibido un tratamiento general; esta es una de las principales razones de las

infecciones recurrentes, mismas que pueden inducir a un alargamiento en el tiempo del tratamiento y que conlleva el uso de antimicóticos orales o tópicos de mayor concentración; lo cual trae como una necesidad, el mejoramiento de las técnicas de identificación de especies de *Candida* para ofrecer una determinación de la especie causante de la infección en un menor tiempo para que se otorgue el tratamiento adecuado (Höfs, Mogavero, & Hube, 2016).

Candida puede causar diversos tipos de infecciones, desde infecciones superficiales en piel; infecciones en la mucosa oral, infecciones vaginales y también infecciones sistémicas denominadas candidemias (C. Tapia, 2008). A pesar de esto, la infección más común por especies de *Candida* se denomina “candidiasis vulvovaginal” y corresponde a una infección de tipo agudo; sin embargo, también existe una forma recurrente de esta patología cuando una mujer presenta cuatro o más episodios de candidiasis durante un año. Del 85% al 95% de las infecciones son provocadas por *Candida albicans* (Miró, 2016).

Una de las infecciones más comunes causadas por esta levadura en especial por la especie *albicans* es la candidiasis oral, que en condiciones adecuadas de crecimiento esta levadura empieza a proliferar causando parches de color blanco que causan ardor o hipersensibilidad; son de fácil tratamiento en pacientes ambulatorios, sin embargo, en pacientes hospitalizados e inmunocomprometidos el tratamiento de dicha infección es un reto debido a que por el estado del paciente, un tratamiento inadecuado o tardío puede hacer progresar esta infección a una candidemia (Velasco, 2013).

Este microorganismo es capaz de ocasionar infecciones sistémicas denominadas candidemia la cual se refiere al aislamiento de *Candida* de uno o más hemocultivos de sangre periférica de un paciente hospitalizado. Estas infecciones predominan en personas inmunocomprometidas, en especial con VIH que pueden debutar con candidiasis oral que, al no ser tratada a tiempo puede progresar a una septicemia (Sanabria & Samudio, 2014).

El tratamiento de las candidemias se ha vuelto más difícil con el pasar del tiempo, debido a la aparición de resistencias por parte de la levadura hacia los medicamentos de primera línea como el fluconazol; sin embargo con el paso del tiempo se han desarrollado nuevos

medicamentos con otros mecanismos de acción que causan menos efectos adversos y son de gran eficacia antifúngica en el tratamiento de candidemias, como la caspofungina o la Anfotericina B (Cervera, 2012).

Los métodos de identificación más utilizados actualmente son los fenotípicos, que son muy dependientes de la técnica y experiencia del analista en el momento de aislar una cepa y, observar su morfología en el microscopio; sin embargo, los métodos automatizados se han implementado con el objetivo de disminuir el tiempo de respuesta que con el uso de estos equipos varía de 18 a 24 horas, mejorar la sensibilidad y además que eliminan las identificaciones erróneas causadas por los métodos convencionales.

Existen otras opciones en cuanto al diagnóstico por laboratorio mediante la aplicación de los métodos moleculares que permiten identificar y diferenciar perfectamente a las especies de *Candida*, mediante el uso de *primers* específicos diseñados para secuencias de ADN únicas de cada especie junto con la realización de controles utilizando cepas de referencia o ATCC.

En el país existen pocos estudios enfocados en la identificación de las especies de *Candida*; se ha realizado estudios en *Candida albicans* pero no se ha determinado la prevalencia de las demás especies causantes de infecciones por levaduras (Theill et al., 2016). Se conoce que actualmente el número de infecciones causadas por especies de *Candida* no *albicans* ha aumentado (M. Tapia, 2015).

En el país no se posee datos acerca de la prevalencia e identificación de las especies de *Candida*; sin embargo, en el 2016 se realizó un estudio en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) en el cual se identificaron mediante métodos automatizados y manuales a cepas almacenadas desde el 2007, cuyos resultados se presentan en la Tabla 1. Con estos datos es posible definir que la especie que más prevalece es *Candida albicans*, seguido por *Candida tropicalis* y *Candida guilliermondii* en menor proporción.

Tabla 1: Número de cepas de *Candida* estudiadas en el periodo 2007-2016 junto con sus características.

Microorganismo	N	Crecimiento	Tubo germinal	Producción de clamidosporas	Pseudohifas	Color y aspecto en Chromo Agar®
<i>C. albicans</i>	60	60 (100%)	60 (100%)	60 (100%)	60 (100%)	Verde cremosa
<i>C. tropicalis</i>	26	26 (100%)	-	-	26 (100%)	Azul cremosa
<i>C. guilliermondii</i>	4	4 (100%)	-	-	4 (100%)	Marrón claro/oscuro
<i>C. glabrata</i>	7	7 (100%)	-	-	-	Marrón claro/oscuro
<i>C. parapsilosis</i>	1	1 (100%)	-	-	1 (100%)	Marrón claro/oscuro
<i>C. lusitaniae</i>	1	1 (100%)	-	-	1 (100%)	Marrón claro/oscuro

Tomado de: Guerrero, J. (2016). *Identificación , susceptibilidad y distribución de especies de Cándida obtenidas de muestras clínicas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), de enero 2007 a abril 2016 .*

En países vecinos, como Colombia se han realizado estudios que abarcan la comparación de las prevalencias de las especies de *Candida* en diferentes hospitales durante un mismo período de tiempo como se observa en la Tabla 2. Al igual que los datos obtenidos en Ecuador, *Candida albicans* sigue siendo la especie más prevalente en todos los hospitales estudiados en Colombia, seguido por *Candida tropicalis* y el único cambio que se observa es el de *Candida parapsilosis* por encima de *Candida glabrata*.

Tabla 2: Distribución de aislados clínicos de *Candida* en Colombia, diferentes hospitales

Aislados de <i>Candida</i> por especies	Hospital A (%)	Hospital B (%)	Hospital C (%)	Hospital D (%)	Hospital E (%)	Hospital F (%)	Hospital G (%)	Aislados
<i>Candida albicans</i>	33 (44.6)	6 (42.8)	50 (63.3)	21 (43.8)	42 (32.7)	51 (38)	11 (44)	214 (56.0)
<i>C. tropicalis</i>	15 (20.3)	2 (14.2)	7 (8.9)	18 (37.5)	12 (17.9)	8 (10.8)	4 (16)	66 (17.3)
<i>C. parapsilosis</i>	18 (24.3)	2 (14.2)	12 (15.2)	6 (12.5)	10 (14.9)	8 (10.8)	5 (20)	61 (16.0)
<i>C. glabrata</i>	2 (2.7)	0	0	2 (4.1)	3 (4.4)	0	3 (12)	10 (2.6)
<i>C. lusitaniae</i>	2 (2.7)	0	0	0	0	1 (1.3)	1 (4)	4 (1.1)
<i>C. krusei</i>	3 (4)	0	0	0	0	0	0	3 (0.8)
Otras <i>Candidas</i>	1 (1)	0	9 (11.3)	1 (2.1)	0	6 (8)	0	17 (4.1)
<i>Candida spp</i>	0	4 (28.6)	1 (1.2)	0	0	1 (1.3)	1 (4)	7 (1.8)
Total aislados	74 (19.4)	14 (3.6)	79 (20.7)	48 (12.5)	67 (17.5)	75 (19.6)	25 (6.5)	382 (44.6)

Tomado de: Cortés, J. A., Jaimes, J. A., & Leal, A. L. (2013). Incidencia y prevalencia de candidemia en pacientes críticamente enfermos en Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, 30(6), 599–604. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182013000600004>

2.2 Marco Teórico

2.2.1 Características generales de la levadura *Candida*

Las levaduras del género *Candida* son patógenos oportunistas que se encuentran formando parte de la microbiota normal de mucosas y piel en el ser humano. A nivel de laboratorio su cultivo se realiza en agar glucosado de Sabouraud y dependiendo de la temperatura de incubación se observan dos tipos de desarrollo, pseudohifas a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) y levaduras a 37°C, indicando su dimorfismo. Las colonias son de color blanquecino, para la identificación del género y especie comumente se emplea Chromo Agar, sin embargo, la técnica carece de una sensibilidad y especificidad altas, por lo acarrea identificaciones erróneas.

Algunas de las características más relevantes de las siete especies de *Candida* de importancia clínica se mencionan a continuación:

2.2.1.1 *Candida albicans*:

Es un hongo diploide, levaduriforme que normalmente se aloja en la mucosa vaginal de las mujeres; sin embargo, se puede comportar como un patógeno oportunista. La candidiasis vaginal representa del 30% al 35% de los casos del síndrome del flujo vaginal después de la vaginosis bacteriana que ocupa el 50% de los casos (Antonio Ciudad-Reynaud, 2015).

Desde el año 1980 se consideraba que *Candida albicans* era el microorganismo causante de la mayoría de infecciones micóticas relacionadas con la atención en salud, y que la mayoría de hongos patógenos eran sensibles a los antifúngicos; sin embargo, últimamente se ha reportado cepas con resistencia secundaria (Sanabria & Samudio, 2014).

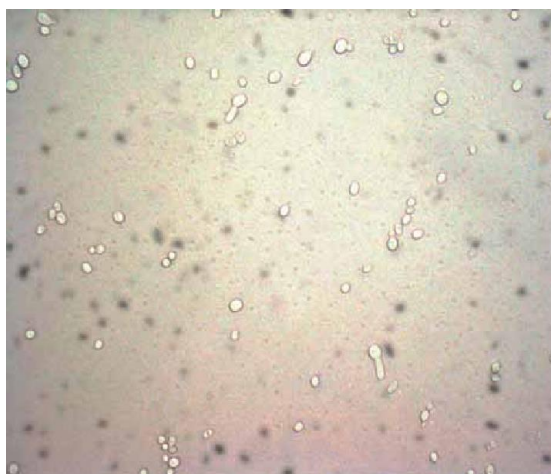


Figura 1: Prueba de tubo germinal para *Candida albicans*, observada microscópicamente con lente de 40x. **Tomado de:** Baena del Valle, J. ; Gomez, C. & Gomez, D. (2011). *Coexistencia de Pseudomonas aeruginosa y Candida albicans en infecciones nosocomiales en cartagena de indias (colombia)* . Biomédica, 9(15), 22–30.

2.2.1.2 *Candida auris*:

Es una especie emergente de este género de levaduras capaz de provocar infecciones invasivas o candidemias; fue descrita por primera vez en Japón en el año 2009 y ha sido descrita como la levadura con más alto grado de mortalidad debido a su alta resistencia al fluconazol.

Fenotípicamente esta levadura es igual a *Candida haemulonii* por lo que puede llevar a identificaciones erróneas en especial con el uso de métodos fenotípicos de identificación de levaduras (Kordalewska, 2017). En el país, no se han realizado estudios acerca de esta levadura, por lo que los datos de su prevalencia aún son desconocidos.

2.2.1.3 *Candida glabrata*:

Es una de las especies más prevalentes junto con *Candida albicans*. Constituye una de las principales levaduras que se encuentran en candidemias sistémicas. Por lo general se encuentra como microbiota normal en la cavidad oral y vaginal del ser humano; sin embargo, una infección causada por esta levadura se relaciona con un largo tiempo de hospitalización, inmunodeficiencias o deterioro clínico del paciente (Torres-rodríguez & Morera, 2010).

2.2.1.4 *Candida guilliermondii*:

Es una levadura que en su mayoría produce onicomycosis pero que también se la puede aislar de infecciones diseminadas o en peritonitis. Es un microorganismo normal presente en la microbiota humana y es de las especies menos aisladas en infecciones causadas por levaduras por lo que su estudio ha disminuido en comparación con otras especies de *Candida* (Pasqualotto, Antunes, & Severo, 2016).

2.2.1.5 *Candida krusei*:

Ha sido una de las levaduras menos estudiadas dentro del género *Candida*, se sitúa como una de las últimas especies identificadas en las infecciones sistémicas causadas por *Candida* debido a su baja patogenicidad; sin embargo, al ser un microorganismo oportunista llega a ser una de las levaduras asociadas a una mortalidad rápida luego de diagnosticarse infección.

Su prevalencia es menor al 10% pero su importancia clínica se enfoca en el fallo terapéutico debido a la resistencia a los azoles, sin embargo sigue teniendo una buena sensibilidad a las equinocandinas como la caspofungina (Forastiero, Monteiro, Jordan, Agorio, & Mellado, 2015).

2.2.1.6 *Candida parapsilosis*:

Es la tercera levadura de importancia clínica del género *Candida* con un porcentaje del 20% de todas las infecciones reportadas; sin embargo, la incidencia de candidemia causada por este microorganismo ha crecido progresivamente en los últimos años y en Latino América su mortalidad está entre 40 a 50% de todos los casos presentados (Villalobos, 2011).

2.2.1.7 *Candida tropicalis*:

Es la segunda levadura causante de infecciones por *Candida* en su mayoría son candidemias que afectan a pacientes inmunodeprimidos, como personas con VIH. En pacientes con leucemia o neutropénicos se ha descrito que *Candida tropicalis* es la principal causa de las infecciones por levaduras.

De la misma manera, se ha demostrado que *Candida tropicalis* se puede contraer en neonatos debido a contaminación cruzada y causar en ellos candidemias que en su mayoría son mortales. Estudios realizados en neonatos determinaron que la susceptibilidad de *Candida tropicalis* a los azoles había disminuido comparado con *Candida albicans* (Kothavade et al., 2010).

2.2.2 Prevalencia de las especies de *Candida* en el país

Los datos acerca de las infecciones causadas por levaduras en el país han sido muy escasos, en un estudio realizado en el 2012 se determinó que los principales patógenos causantes de candidemias y presentes en hemocultivos eran *Candida albicans* con un 42,8% y *Candida glabrata* con un 14,2% (Estrada-barraza et al., 2011).

En el año 2016 se realizó un estudio que buscaba determinar la distribución de las especies de *Candida* durante el periodo desde el 2007 hasta el 2016, se lo realizó en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) los resultados de dicho estudio se presentan en la Tabla 1 expuesta anteriormente (Guerrero, 2016).

2.2.3 Factores de virulencia

Los principales factores de virulencia que presentan las levaduras del género *Candida* son su capacidad de dimorfismo, sus proteasas y fosfolipasas; estas enzimas les confieren la capacidad de adherirse e invadir tejidos y evadir la fagocitosis respectivamente (Salas, Miranda & Keyna, 2010).

2.2.3.1 Dimorfismo

Las levaduras del género *Candida*, en especial *Candida albicans* poseen la característica de tomar diferente forma dependiendo la temperatura a la que se encuentren; por lo tanto, puede presentarse en forma de levadura o en forma filamentosa con pseudohifas (Andrade, 2014). Este cambio es el factor de virulencia más importante de esta levadura ya que su forma de levadura se presenta para colonizar al individuo y su forma de hifa se presenta para invadir tejidos debido a que esta secreta las enzimas necesarias para la destrucción de las células (Ramos & Desgarennnes, 2005).

2.2.3.2 Fosfolipasas

La actividad de las fosfolipasas en *Candida* se debe a una expresión del gen PLB1, que es la misma que regula su cambio de levadura a hifa. (Ombrella & Racca, 2008) Se ha determinado que esta enzima es de principal importancia cuando la levadura invade la célula debido a que necesita romper la membrana celular, gracias a esto estos microorganismos pueden continuar invadiendo los tejidos celulares con la finalidad de llegar al torrente sanguíneo (Mensa et al., 2011).

2.2.3.3 Proteasas

Candida posee enzimas de secreción aspártico proteasas (SAP), estas son codificadas por los genes del mismo nombre. Su papel dentro de la infección causada por esta levadura se encuentra en la fase inicial cuando necesita adherirse a las células del paciente y a la destrucción de las estructuras de la superficie celular que posteriormente será invadida; sin embargo, se ha determinado que estas proteínas pierden su utilidad cuando la levadura ingresa al torrente sanguíneo (Ramos & Desgarennnes, 2005).

2.2.4 Infecciones en pacientes vulnerables

En mujeres embarazadas existe una mayor predisposición para contraer esta enfermedad debido a factores como la carga de hormonas o los niveles de glucógeno, en especial durante los meses finales del embarazo. Duque *et al.*, en un estudio realizado en el año 2009 señalan que en Colombia y Estados Unidos la candidiasis vulvovaginal afecta principalmente a mujeres entre los 30 y 40 años (Duque, Uribe, Soto, & Alarcón, 2009).

2.2.5 Tratamiento

El tratamiento para la mayoría de infecciones causadas por *Candida* se lo realiza de manera tópica o de forma oral; no obstante, de cualquiera de las dos maneras se usan fármacos del grupo de los azoles como estrategia para combatir a este microorganismo. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis del ergosterol lo que provoca un cambio en la composición de la membrana del hongo que está formada por lípidos, alterando su permeabilidad y provocando una destrucción por un cambio osmótico (Antonio Ciudad-Reynaud, 2015).

Los pacientes inmunocomprometidos como es el caso de personas que padecen de cáncer o VIH es diferente; estos casos se deben se debe tratar rápidamente debido a su alto grado de mortalidad que ha causado en los últimos años; en la mayoría de los casos se usa caspofungina o anfotericina B ya que estas tienen una respuesta favorable en un 71,26% de los casos (Mensa et al., 2011).

2.2.6 Identificación fenotípica de especies de *Candida*.

La identificación de *Candida* en el laboratorio se ha venido realizando de manera fenotípica por un largo tiempo, debido a su facilidad y bajo costo; sin embargo, esto también ha significado una falla en la identificación debido a que muchas veces el analista no está totalmente capacitado para realizar una correcta identificación o porque no se posee las pruebas para determinar a ciertas especies de *Candida*.

Actualmente existen métodos estandarizados para la identificación fenotípica lo que facilita la interpretación de los resultados por parte del analista para que así se obtenga una identificación correcta de la especie de *Candida* presente en la muestra.

2.2.6.1 Prueba del tubo germinal

Esta prueba se basa en la inoculación de la colonia de levadura en suero humano, posteriormente se incuba a 37°C por 3-4 horas y luego se observa en el microscopio en el campo de 40x, para determinar si esta levadura creó un filamento a partir de su célula germinal; ha sido una prueba muy útil para la identificación de *Candida albicans*; sin embargo, se ha detectado que otras especies de *Candida* pueden ser positivas para esta prueba si se las incuba por un periodo mayor de tiempo (Cuesta, 2007).

2.2.6.2 Auxonograma

El auxonograma es una técnica bioquímica de identificación fenotípica basada en las propiedades de cada especie de levadura para asimilar diferentes carbohidratos. Para su desarrollo se necesitan varios azúcares en los cuales se inoculará a la levadura y se realizará su incubación por 24-48 horas, el objetivo es observar la capacidad metabólica frente a cada azúcar del panel. Posteriormente con algoritmos previamente establecidos se realiza la identificación de la especie de *Candida* presente (Andrade, 2014).

Levadura	* Asimilación de:														Total
	GLU	XIL	ADO	GAL	INO	SOR	MDG	CEL	LAC	MAL	TREH	MLZ	RAF	AcL	
<i>C. guillermoidii</i>	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	11
<i>C. tropicalis</i>	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	10
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1/1	1/1	1/1*	1/1	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	1/1	9
<i>C. albicans</i> ATCC 17111	1/1	1/1	1/1*	1/1	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	1/1	9
<i>C. parapsilosis</i>	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1*	0/0	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	9
<i>C. kefyr</i>	1/1	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	5
<i>C. glabrata</i>	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	2
<i>C. krusei</i>	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	2
Total	8/8	5/5	5/5	6/6	0/0	5/5	5/5	2/2	1/1	5/5	6/6	3/3	2/2	4/4	57

Glucosa: GLU, xilosa: XIL, adonitol: ADO, galactosa: GAL, inositol: INO, sorbitol: SOR, metil alfa-D-glucopiranosido: MDG, celobiosa: CEL, lactosa: LAC, maltosa: MAL, trehalosa: TREH, melecitosa: MLZ, rafinosa: RAF, ácido láctico: AcL. * los datos son expresados como respuesta positiva del carbohidrato asimilado por el método alternativo/respuesta positiva del carbohidrato asimilado por la técnica de Wickerham; * reacción dudosa.

Figura 2: Auxonograma empleado para la identificación de levaduras del género *Candida*. Tomado de: Rodríguez, T; Zhurbenko, R (2010) *Identificación de especies de Candida de importancia clínica con un método auxonograma modificado*. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v62n1/mtr08110.pdf>

2.2.6.3 Zimograma

Es una técnica bioquímica al igual que el auxonograma pero con la diferencia que esta busca la capacidad de la levadura para fermentar diferentes azúcares, esto se observa mediante el viraje del pH y la producción de gas en la cámara de reacción.

2.2.6.4 Agares cromogénicos

Los agares cromogénicos se basan en colorantes que posee el medio y se liberan cuando actúa frente a enzimas específicas de cada especie de *Candida*, con esto se facilita la identificación de la especie de una manera rápida; sin embargo, estos métodos no presentan un 100% de sensibilidad por lo que podrían llegar a existir identificaciones erróneas de cepas de esta levadura.

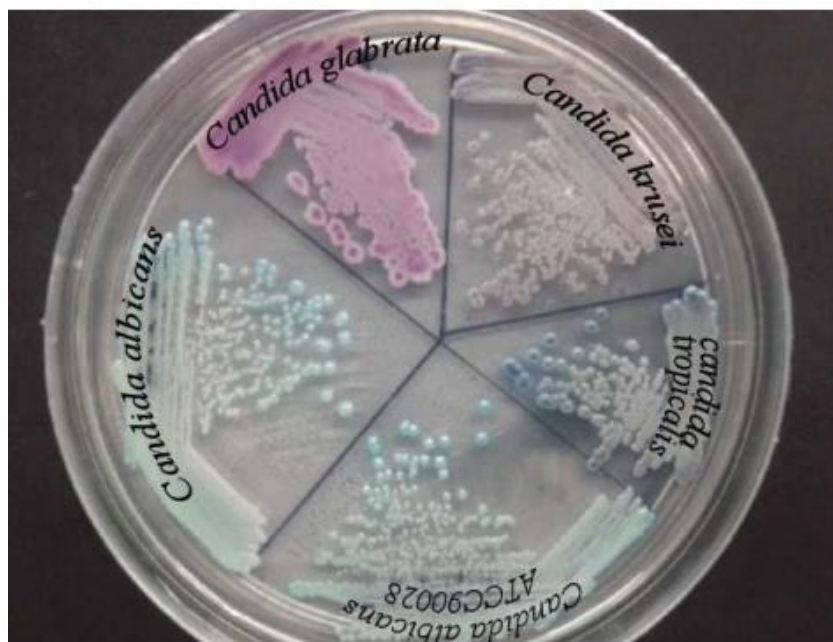


Figura 3: Agar cromogénico utilizado para identificar especies de *Candida*. **Tomado de:** Dharmeswari et al., T. (2014). Use of Chromogenic Medium for Speciation of *Candida* Isolated From. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 6(1), (1-5)

2.2.7 Métodos de identificación molecular para *Candida*

En la actualidad se han implementado nuevas metodologías que facilitan el diagnóstico y la identificación de agentes patógenos; con una mejora en el tiempo de respuesta se puede emplear un tratamiento mucho más efectivo que colabore con la recuperación del paciente. Para esto, se ha buscado técnicas de biología molecular siendo la principal la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Carvalho y colaboradores. en su estudio publicado en el 2007 elaboraron un protocolo donde definieron las características para desarrollar un ensayo molecular que identifique a 8 especies de importancia clínica de *Candida* en una sola PCR. Este estudio amplifica una región ITS común entre todas las levaduras y posteriormente se une con secciones específicas de cada especie para posteriormente ser revelados en una corrida electroforética (Carvalho, Martins, Rodrigues, & Ludovico, 2007).

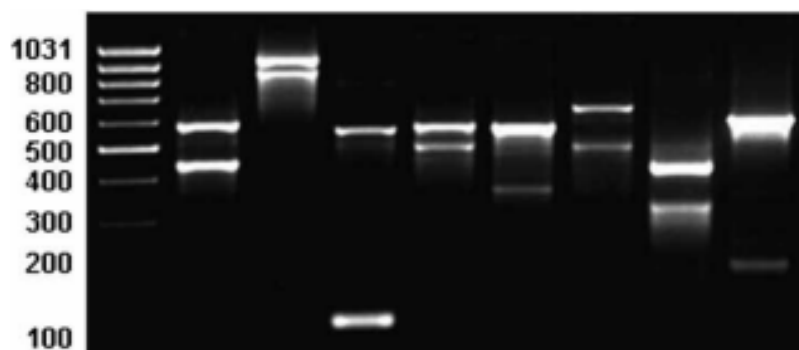


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa para la identificación de especies de *Candida*. Tomado de: Carvalho, A., Martins, M. L., Rodrigues, A. G., & Ludovico, P. (2007). *Multiplex PCR identification of eight clinically relevant Candida species*, 619–627. <https://doi.org/10.1080/13693780701501787>

2.3 Marco Conceptual

- ADN: ácido desoxirribonucleico, biopolímero que contiene el material genético de las células y la información para sintetizar proteínas (Carvalho et al., 2007).
- Agarosa: es un extracto polisacárido obtenido de algas del género *Gelidium* y *Gracilaria*, su contenido son subunidades de galactosa (Lee, Costumbrado, Hsu, & Kim, 2012).
- Anfotericina B: fármaco antibiótico y antifúngico, actúa en los hongos mediante la unión al ergosterol de la membrana fúngica. Su uso es limitado para Candidiasis sistémicas (Mensa et al., 2011).
- ATCC: *American Type Culture Collection*. Es la institución encargada de proveer cepas estándar para la realización de controles de calidad o estudios de investigación (Estrada-barraza et al., 2011).
- Auxonograma: es un método de identificación basada en la asimilación de nutrientes con la finalidad de obtener patrones características de diferentes levaduras (Rodríguez, Zhurbenko, Martínez, Zayas, & Rodríguez, 2010).
- Azoles: familia de medicamentos antifúngicos, capaces de impedir la formación de ergosterol, un compuesto importante en la estructura del hongo (Forastiero et al., 2015).
- Bandas electroforéticas: son el resultado de la migración del ADN en el gel de agarosa (Lee et al., 2012).
- *Candida*: género de hongos levaduriformes encontrados en mucosa oral, digestiva y genital del ser humano (Cervera, 2012).

- Candidemia: se la define como el aislamiento de *Candida* de cultivos de sangre periférica, esta puede ser diseminada aguda, crónica o transitoria (Mensa et al., 2011).
- Caspofungina: antimicótico sistémico, inhibe síntesis del Beta-(1,3)-D-glucano, componente esencial de la pared celular de muchas levaduras en especial de *Candida spp* (Sanabria & Samudio, 2014).
- Chromo Agar: es un medio de cultivo para la identificación de *Candida* a partir de muestras clínicas, inhibe el crecimiento de bacterias y se caracteriza por los colores que produce con diferentes especies de levaduras (Dickinson, 2014).
- Electroforesis: técnica utilizada en biología molecular para diferenciar los tamaños de ADN mediante su movilidad en un campo eléctrico (Lee et al., 2012).
- Especificidad: capacidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que pueden estar presentes y afectar su desempeño (Örnemark, 2014).
- Fluconazol: fármaco de la familia de los azoles utilizado como medicamento de primera línea ante la infección por *Candida* (Kothavade et al., 2010).
- Límite de detección: es la cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada en una única medición (Örnemark, 2014).
- MicroScan: equipo automatizado para la identificación de microorganismos, fabricado por la marca Beckman Coulter®
- Onicomicosis: enfermedad de las uñas causadas por hongos (Ballesté, Mousqués, & Gezuele, 2003).

- *Primers*: son pequeños fragmentos de ADN sintético, no mayores a 50 nucleótidos y que son complementarios al inicio y al final del fragmento de ADN que debe ser amplificado (Lee et al., 2012).
- Phoenix: equipo automatizado para la identificación de microorganismos, entre ellos levaduras, fabricado por Becton Dickinson ®
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Multiplex: técnica utilizada con múltiples *primers* para la identificación de varios genes sobre una misma muestra (Patel, Bosamia, Bhalani, Singh, & Kumar, 2015).
- Termociclador: equipo utilizado para realizar PCR, consiste en bloques que cambian de temperatura en cortos periodos de tiempo de manera homogénea para realizar todos los ciclos que comprenden una PCR.
- T_m: temperatura de fusión, es la temperatura en la cual la concentración de ADN de simple cadena y *primers* se equiparan (Morschhäuser, 2002).
- Vitek: equipo para la identificación automatizada de microorganismos como *Candida*, fabricado por la marca Biomérieux ®
- Zimograma: es un método de identificación basada en la fermentación de diferentes productos que finalizan con la producción de gas por parte de las levaduras (Rodríguez et al., 2010).

CAPÍTULO III

3.1 MARCO METODOLÓGICO

3.1.1 Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo observacional descriptivo debido a que se va a observar y determinar el protocolo de una técnica de amplificación de ADN mediante el análisis de sus condiciones de desempeño como, especificidad y límite de detección de una técnica de amplificación de ADN.

3.2 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Tabla 3: Operacionalización de las variables

Objetivo	Variable	Dimensión	Categoría	Definición conceptual	Indicador	Tipo de variable	Instrumento de medición
Establecer el mejor método de extracción de ADN en cepas de <i>Candida</i> , sin el uso de la enzima Liticasa.	Extracción de ADN	Concentración	50-100	El método de extracción, mediante el cual se pueda obtener la mejor concentración de ADN	ng/uL	Cuantitativa	Espectrofotómetro/ Electroforesis
		Pureza	1.8-2				
Establecer las condiciones adecuadas de la técnica de PCR multiplex: temperaturas de trabajo de cada fase del ciclo de PCR, concentración de reactivos, tiempo y número de ciclos para identificar las especies de <i>Candida</i> .	Temperatura de melting	Amplificación	55 ° C	La temperatura ideal con la cual se puede realizar una identificación óptima de <i>Candida</i>	Bandas definidas luego de la electroforesis	Cualitativa	PCR/electroforesis
			56 ° C				
		No amplificación	57 ° C				
			58 ° C				
			59 ° C				
	Concentración de <i>primers</i>	Amplificación	60 ° C	La concentración mínima de primer con la cual se puede realizar una identificación óptima de la especie de <i>Candida</i>			
			0,1 µM				
		No amplificación	0,2 µM				
			0,3 µM				
			0,4 µM				
	Tiempo de cada ciclo de hibridación	Amplificación	0,5 µM	El tiempo de hibridación con el cual se puede realizar una amplificación óptima de la especie de <i>Candida</i>			
			20 segundos				
		No amplificación	30 segundos				
			40 segundos				
Número de ciclos	Amplificación	25	Los ciclos ideales con los cuales se puede realizar una amplificación óptima de la especie de <i>Candida</i>				
	No amplificación	30					
		35					

Determinar la especificidad de cada par de <i>primers</i> para la identificación de las especies de <i>Candida</i> por PCR multiplex	Especificidad analítica de la PCR para la identificación de <i>Candida</i>	Identificación de una especie específica Identificación de más de una especie	Si identifica No identifica	La capacidad de cada primer para identificar únicamente a la especie para la cual ha sido diseñado, evitando falsos positivos.	Única banda específica definida luego de la electroforesis	Cualitativa	Electroforesis
Determinar el límite de detección de la PCR multiplex frente a las diferentes especies de <i>Candida</i> .	Límite de detección de la PCR	Última concentración detectable mediante PCR	Detección No detección	La concentración mínima de ADN en la muestra que puede ser detectado por la técnica de PCR y revelado por electroforesis	Bandas definidas luego de la electroforesis	Cualitativa	Electroforesis

Elaborado por: Christian Rosales, 2018

3.3 MATERIALES y PROCEDIMIENTOS

3.3.1 MATERIALES UTILIZADOS

Cultivo y aislamiento de *Candida*

- Cajas plásticas mono Petri
- Guantes de nitrilo talla M. Santa Cruz Biotechnology
- Agar Sabouraud.
- Cepas ATCC
- Asa metálica
- Hipoclorito de Sodio
- Mechero
- Incubadora. Memmert
- Kit de tinción Gram
- Microscopio. Olympus

Extracción y amplificación de ADN

- Kit de extracción de ADN-PureLink DNA Mini Kit. Invitrogen
- Kit de extracción de ADN- High pure PCR template preparation Kit. Roche
- Guantes de Nitrilo libres de talco. Santa Cruz Biotechnology Inc.
- Puntas con filtro, volumen de 0.1-10 µL. Invitrogen
- Puntas sin filtro, volumen de 0.1-10 µL. Invitrogen
- Puntas con filtro, volumen de 2-20 µL. Axygen
- Puntas con filtro, volumen de 200 µL. Axygen
- Puntas con filtro, volumen de 1000 µL. Axygen
- Balanza analítica. Boeco
- Bloque Térmico. Labnet
- Vórtex. Labnet
- Buffer TE 1x. Promega
- Buffer TAE 10X. Invitrogen
- Agua Grado Molecular

- Tubos eppendorf 1,5 mL
- Tubos eppendorf 0,5 μ L
- High Speed Microcentrifuge. Corning
- Cabina de Seguridad. Bio Air
- Cabina de Seguridad. C.B.S Scientific.
- Nano Drop 2000. Thermo Scientific
- *Primers* Forward y Reverse para los Genes *ITS 1* y *2*
- GoTaq Green Master Mix. Promega
- Termociclador de triple cabezal. Applied Biosystems
- Termociclador. Labnet
- Agarosa Ultra Pura. Invitrogen
- Ladder 100 pb. Promega
- Loading Buffer. Promega
- SYBR Safe DNA gel stain. Invitrogen
- Cámara de Electroforesis. Labnet
- Peine de 10 pocillos para electroforesis. Labnet
- Peine de 17 pocillos para electroforesis. Labnet
- Fuente de Poder. CBS Scientific.
- Fotodocumentador. BioRad
- Software: Image Analysis.

3.4 FASES METODOLÓGICAS

3.4.1 Fase I. Aprobación del proyecto de investigación

Se realizó la presentación del plan de trabajo de titulación, mismo que fue revisado y aprobado por el coordinador de la carrera de Bioquímica Clínica de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. En este estudio no se necesitó de revisiones por parte del comité de Ética en la Investigación en Seres humanos debido a que no se utilizaron muestras provenientes de pacientes

El estudio se desarrolló con siete especies diferentes de *Candida*; se utilizaron siete cepas de referencia ATCC correspondientes a la totalidad de especies incluidas en este estudio como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 4: *Cepas de referencia (ATCC) utilizadas en este estudio.*

Especie	Referencia ATCC
<i>Candida albicans</i>	10231
<i>Candida auris</i>	11903
<i>Candida glabrata</i>	2001
<i>Candida guilliermondii</i>	20316
<i>Candida krusei</i>	6258
<i>Candida parapsilosis</i>	22019
<i>Candida tropicalis</i>	750

Fuente: Elaborado por Christian Rosales, 2018

Dichas cepas al ser de referencia fueron identificadas con anterioridad por lo que su uso fue netamente para realizar la evaluación del desempeño de la técnica de biología molecular que ha sido desarrollada en el laboratorio.

3.4.2 Fase II. Procedimiento de laboratorio

3.4.2.1 Diseño de *primers*

Mediante búsquedas en GenBank se obtuvieron las secuencias de *primers* para PCR de punto final que permitieron identificar a cada una de las siete especies diferentes de levaduras del género *Candida*. Los *primers* escogidos amplifican la región del ITS 1 y 2 para las especies *albicans*, *glabrata*, *guilliermondii*, *krusei* y *tropicalis*, como se observa en la Figura 5. En el caso de *Candida auris* se analizó la región 5.8s y para *Candida parapsilosis* la TopoIsomerasa 2.



Figura 5: Esquema del ITS 1 y 2 de *Candida* y su relación con los *primers* especie específico. Adaptado de: Carvalho, A., Martins, M. L., Rodrigues, A. G., & Ludovico, P. (2007). *Multiplex PCR identification of eight clinically relevant Candida species*, 619–627. <https://doi.org/10.1080/13693780701501787>

Utilizando el programa MEGA V. 7.0 se realizaron los alineamientos de los *primers* con la secuencia de ADN descargada desde GenBank; se observó que cada primer realice el alineamiento únicamente con la especie para la cual fue diseñado.

Una vez alineados los *primers*, se procedió con la compra de los mismos; su calidad y concentración fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% por 20 minutos. Los *primers* adquiridos fueron sintetizados según las características expuestas en la Tabla 5.

Tabla 5 Secuencias de primers utilizadas para la identificación de las siete especies de *Candida*.

Especie	Nombre primer	Secuencia 5' - 3'	Pb	Gen	Referencia
<i>ITS</i>	UNI 2	GTCAAACCTTGGTCATTTA			
<i>C.. albicans</i>	Calb	AGCTGCCGCCAGAGGTCTAA	448	ITS 1-2	(Carvalho et al., 2007)
<i>C. glabrata</i>	Cgla	TTGTCTGAGCTCGGAGAGAG	530		
<i>C. guilliermondii</i>	Cgui	TTGGCCTAGAGATAGGTTGG	668		
<i>C.. krusei</i>	Ckru	CTGGCCGAGCGAACTAGACT	169		
<i>C. tropicalis</i>	Ctrop	GATTTGCTTAATTGCCCCAC	507		
<i>C. parapsilosis</i>	CparF	AGCAATCAAGGAGAGGTCGCCA	558	Topoisomerasa II	(García et al., 2017)
	CparR	CTCGTACCAGCCTTGTTTGCATC			
<i>C. auris</i>	CauF	CGCACATTGCGCCTTGGGGTA	163	5.8S rDNA	(Kordalewska, 2017)
	CauR	GTAGTCCTACCTGATTTGAGGCGAC			

Elaborado por: Christian Rosales, 2018

3.4.2.2 Cultivo de las diferentes levaduras del género *Candida*.

Las cepas ATCC se conservaron en refrigeración de 2-8°C hasta el momento de su uso, como lo establece su fabricante en las indicaciones observadas en el Anexo 1; las mismas fueron activadas utilizando agua grado molecular, luego sembradas en agar Sabouraud y colocadas en la incubadora a 37° C. Se realizó la inspección de crecimiento a 24 y 48 horas mediante la visualización macroscópica de las características de las colonias; a continuación, se las observó microscópicamente mediante tinción de Gram con la finalidad de evidenciar su desarrollo. Estas muestras fueron procesadas a las 48 horas desde su cultivo, evitando así la muerte de las colonias.

3.4.2.3 Extracción de ADN de *Candida*.

Se ejecutó la extracción de ADN de las 7 diferentes muestras de *Candida* por cuatro métodos que fueron: dos kits comerciales y dos métodos caseros, uno por ebullición y otro

por choque térmico. Para la extracción mediante el método comercial High Pure PCR Template Preparation Kit, choque térmico y ebullición se utilizaron los tubos Eppendorf de 1,5 mL que contenían 500 µL de Buffer TE 1x en el que se realizó una suspensión de la levadura previamente sembrada en agar Sabouraud y se procedió con la extracción que se detalla en los Anexos 2, 3 y 4 respectivamente; por otra parte, para la extracción por el método PureLink DNA mini kit se realizó una suspensión de la colonia directamente en el buffer de digestión incluido, este paso fue el punto de partida para seguir con el protocolo de extracción detallado en el Anexo 5.

La concentración y pureza del ADN extraído fue cuantificado mediante el equipo *Nanodrop 2000* de *Thermo Fisher Scientific*, como se observa en el Anexo 6.

Las bandas de ADN se visualizaron mediante corridas electroforéticas en gel de Agarosa con las siguientes condiciones: 90 voltios por 20 minutos con el gel a concentración del 1%; a continuación el ADN fue almacenado en congelación a -20 °C.

3.4.2.4 Preparación de la Master Mix y concentración de *Primers*

Como punto de partida se realizaron tres diferentes cálculos de Master mix para determinar la concentración adecuada de *primers* a utilizarse, según se muestra en la tabla 6. Se realizaron reacciones individuales por cada especie antes de realizar una PCR multiplex y con esto se determinó que la concentración adecuada de *primers* era de 5 µM.

Tabla 6: *Determinación de la concentración de primers en la Master Mix.*

Master Mix			
Reactivos	Concentración 10 µM	Concentración 5 µM	Concentración 2.5 µM
GoTaq Green	6,25 µL	6,25 µL	6,25 µL
Primer Forward	0,5 µL	0,3 µL	0,1 µL
Primer Reverse	0,5 µL	0,3 µL	0,1 µL
H ₂ O molecular	4,25 µL	4,65 µL	5,05 µL
ADN		1,0 µL	
Volumen final		12,5 µL	

Elaborado por: Christian Rosales, 2018

Los gradientes de temperatura se ejecutaron mediante reacciones individuales con la finalidad de estandarizar el protocolo de cada especie; en todos los caso se utilizó el mismo programa de termociclado, con temperaturas acorde a la T_m teórica de cada primer; todo esto junto con la preparación de la MasterMix descrita a continuación.

Tabla 7 *Preparación de la MasterMix para la estandarización de cada especie.*

Reactivos	Volumen (μL)
Taq	6,25
Primer Forward	0,2
Primer Reverse	0,2
Agua grado molecular	4,85
ADN	1
Total	12,5

Fuente: Elaborado por Christian Rosales, 2018

3.4.2.5 Determinación del protocolo de trabajo

Para cada especie se utilizaron tres programas de trabajo empleando el termociclador marca Applied BioSystems, con la finalidad de determinar las temperaturas, números de ciclos y tiempo adecuados para una correcta amplificación de los productos de la PCR.

En primera instancia se realizaron reacciones con una activación de la enzima por 5 minutos; sin embargo, estos datos no se expusieron debido a que el protocolo recomendado por el fabricante expone que la activación adecuada de la Taq Polimerasa debe ser de 10 minutos.

Tabla 8: Programa de termociclado para la identificación de especies de *Candida*, utilizando una denaturación inicial de 10 minutos a 94°C.

Etapas	Programa de termociclado		
	25 Ciclos	30 Ciclos	35 Ciclos
Activación (10 min)	94 °C	94 °C	94 °C
Denaturación (30s)	94 °C	94 °C	94 °C
Hibridación (30s)	Tm °C	Tm °C	Tm °C
Elongación (45s)	74 °C	74 °C	74 °C
Elongación final (10min)	74 °C	74 °C	74 °C
Enfriamiento	4°C	4°C	4°C

Fuente: Elaborado por Christian Rosales, 2018

El programa con el que se decidió trabajar fue el de 30 ciclos, ya que al usarlo, presentaba bandas definidas para cada una de las especies, cabe recalcar que en los protocolos de PCR se aumenta el número de ciclos en el caso de que se requiera obtener una banda más definida que no se evidencia claramente a ciclos más bajos.

El primer gradiente de temperatura de la PCR individual se lo realizó para la cepa *Candida albicans* ATCC 10231; se amplificó el ITS1 que en esta especie presenta un tamaño de 448 pares de base. La Tm teórica de este par de *primers* fue en promedio 59°C por lo que el programa se repitió mediante un gradiente de seis diferentes temperaturas entre 57° a 62° C.

La segunda especie estandarizada fue la cepa de *Candida auris* ATCC 11903; se amplificó la región que codifica la sección 5.8S que en esta especie presenta un tamaño de 169 pares de base. Los *primers* presentaron una Tm teórica de 60°C en promedio, por lo que se realizó un gradiente de seis diferentes temperaturas entre 57° a 61° C.

La estandarización de las cepas de *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii* y *Candida krusei* se las realizó a la par debido a que sus respectivos *primers* tenían una Tm teórica entre 56 -58 °C, facilitando la realización de los gradientes de temperatura en un solo programa de Termociclado. Se amplificó la región del ITS 1-2 que, en las especies *glabrata*, *guilliermondii* y *krusei* poseen un peso molecular de 530, 650 y 160 pb. Se efectuaron las reacciones mediante gradiente con temperaturas que fueron desde 55 °C hasta 60°C y la revelación se evidenció mediante geles de electroforesis. *Candida*

parapsilosis fue estandarizada mediante la amplificación de la región de la TopoIsomerasa II que posee un peso molecular de 570 pb, la Tm teórica de los *primers* utilizados fue de 60°C por lo que se realizó el gradiente temperatura desde 56° a 63°C, dando como resultado amplificaciones con bandas definidas hasta 61°C, como se observa en la figura 9 (F); por lo tanto, se estableció una Tm óptima de 57°C.

Para *Candida tropicalis* se amplificó una parte de la región del ITS 1, el cual tiene un peso de 507 pares de bases, los *primers* de esta especie definieron la Tm teórica de 55 por lo que el gradiente se lo realizó con temperaturas entre 53-58°C. Posteriormente se reveló mediante electroforesis que estos *primers* fueron capaces de detectar a dicha especie en las seis temperaturas probadas.

Luego de la estandarización individual de cada especie, se establecieron dos reacciones de MasterMix con la finalidad de facilitar la identificación de las bandas obtenidas en los geles de electroforesis, debido a que por las relaciones de peso molecular podían existir determinaciones erróneas al determinar *Candida krusei* con *Candida auris* y entre *Candida glabrata* con *Candida tropicalis*; además se tomó en cuenta la prevalencia de las especies de *Candida* para realizar las dos reacciones, de manera que, la primera reacción abarcó a las cuatro especies más prevalentes de *Candida* en Ecuador, es decir, *albicans*, *glabrata*, *guilliermondii* y *tropicalis*. La segunda MasterMix abarca a las especies *auris*, *krusei* y *parapsilosis*. Las condiciones que se emplearon para la preparación de la MasterMix fueron que los *primers* tengan la misma concentración, y que se obtenga un volumen final de reacción de 25 µL, como se puede observar en la tabla 9 y 10.

Tabla 9: Preparación de la primera Master Mix para la PCR multiplex: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis*.

Master Mix 1 PCR Multiplex				
	C inicial	unidad	C. final	V. final
Taq	2	U/L		12,5
Primer UNI	10	μM	0,1	0,3
Calb	10	μM	0,1	0,3
Cgla	10	μM	0,1	0,3
Ckru	10	μM	0,1	0,3
Ctro	10	μM	0,1	0,3
H2O				9,0
ADN				2
Total:				25

Fuente: Elaborado por Christian Rosales, 2018

Tabla 10: Preparación de la segunda Master mix para la PCR multiplex: *C. auris*, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*.

Master Mix 2 PCR Multiplex				
	C inicial	unidad	C. final	V. final
Taq	2	U/L		12,5
Primer UNI	10	μM	0,1	0,3
Cgui	10	μM	0,1	0,3
Caur F	10	μM	0,1	0,3
Caur R	10	μM	0,1	0,3
Cpar F	10	μM	0,1	0,3
Cpar R	10	μM	0,1	0,3
H2O				8,7
ADN				2
Total:				25

Fuente: Elaborado por Christian Rosales, 2018

3.4.2.6 Ensayos para el límite de detección

Se ejecutó una primera dilución a partir del ADN extraído mediante el kit comercial de Invitrogen para igualar todas las concentraciones de ADN a 20 ng/uL; luego, una segunda dilución se realizó 1/10 para alcanzar el valor de aproximadamente 2 ng/uL, ya que esta concentración es aún un valor alto que puede ser amplificado mediante PCR. A esta segunda dilución se la cuantificó en el *NanoDrop 2000* y seguidamente se realizaron 12 diluciones seriadas dobladas para el análisis, como se detalla en la tabla 11.

Tabla 11: *Diluciones del ADN obtenido de las siete especies de Candida.*

Número de dilución:				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
especie	concentración (ng/uL)	dilución	Nueva concentración (ng/uL)	1/10	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
albicans	84,3	1/4	20,2	2,02	1,01	0,51	0,25	0,13	0,06	0,032	0,016	0,008	0,004	0,0020	0,0010	0,0005
auris	125,1	1/6	22,5	2,25	1,13	0,56	0,28	0,14	0,07	0,035	0,018	0,009	0,004	0,0022	0,0011	0,0005
glabrata	136,7	1/6	26,1	2,61	1,31	0,65	0,33	0,16	0,08	0,041	0,020	0,010	0,005	0,0025	0,0013	0,0006
guilliermondii	133,7	1/6	23	2,3	1,15	0,58	0,29	0,14	0,07	0,036	0,018	0,009	0,004	0,0022	0,0011	0,0006
krusei	72,6	1/4	18	1,8	0,90	0,45	0,23	0,11	0,06	0,028	0,014	0,007	0,004	0,0018	0,0009	0,0004
parapsilosis	118,9	1/6	24,3	2,43	1,22	0,61	0,30	0,15	0,08	0,038	0,019	0,009	0,005	0,0024	0,0012	0,0006
tropicalis	81,4	1/4	20,1	2,01	1,01	0,50	0,25	0,13	0,06	0,031	0,016	0,008	0,004	0,0020	0,0010	0,0005

Fuente: Elaborado por Christian Rosales, 2018

Posteriormente, se realizaron 11 reacciones por cada especie para la determinación del límite de detección utilizando la preparación de la Master Mix detallada en la tabla 9 y 10; añadiendo las diluciones de ADN preparadas previamente; se evidenció mediante electroforesis la mínima concentración de ADN en la cual la técnica era capaz de amplificar una banda la cual se especifica en la figura. No se utilizó la primera dilución debido a que su concentración todavía era teóricamente alta.

3.4.2.7 Ensayos para determinación de especificidad

Para la determinación de la especificidad de los *primers* por cada especie se realizaron reacciones utilizando la Master Mix que fue elaborada para las reacciones individuales. Se prepararon siete reacciones de PCR para cada primer, en la primera reacción se adicionó ADN de la especie que debía identificar el primer y en las 6 reacciones restantes se agregó ADN de las demás especies de *Candida* con la finalidad de no obtener ningún resultado positivo. Se evidenció mediante electroforesis que cada primer solo amplificaba la reacción en la cual se aplicaba el ADN correspondiente a su especie.

3.5 Control de calidad

El control de calidad de los medios Sabouraud se lo realizó a través de la evaluación de sus características físicas y para determinar la esterilidad del medio se los incubó a 37°C por 24 horas y se observó que no existiera crecimiento como contaminación.

Se utilizaron siete cepas ATCC que correspondían a todas las especies del género *Candida* como controles positivos de amplificación al momento de identificarlas por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

3.6 Análisis y presentación de resultados

Los procedimientos de laboratorio y datos obtenidos acerca de las mejores condiciones de trabajo de la PCR multiplex se presentan en un diagrama de flujo que permita la realización de la técnica por el personal de laboratorio que requiera identificar a una especie de *Candida*.

CAPÍTULO IV

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Resultados del cultivo de las levaduras

Pasadas las 48 horas de crecimiento de las cepas, se las extrajo de la incubadora y se observó un aislamiento y crecimiento positivo de colonias blancas con bordes definidos redondeados y forma convexa como se observa en la Figura 6 y se detalla en la tabla 10.

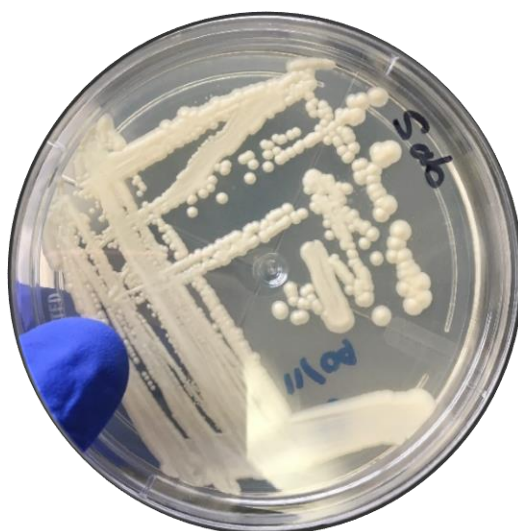


Figura 6: Colonias macroscópicas de *Candida albicans* en agar Sabouraud.

Elaborado por: Christian Rosales, 2018

Tabla 12: Características macroscópicas de *Candida albicans*.

Características macroscópicas	<i>Candida albicans</i>
Forma	Circular
Elevación	Convexa
Borde	Entero

Elaborado por: Christian Rosales, 2018

A todas las muestras se les realizó la coloración de Gram con la finalidad de observar levaduras de forma ovoide y de color morado oscuro, como se observa en la Figura 7.

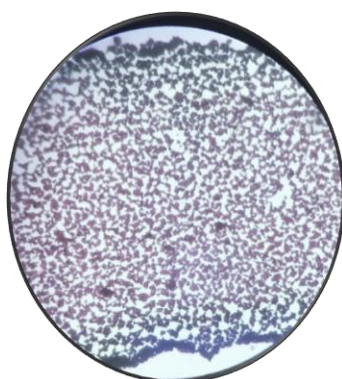


Figura 7: Coloración Gram en la que se observa una gran cantidad de levaduras con forma ovoide correspondientes a *Candida auris*. **Elaborado por:** Christian Rosales, 2019

4.1.2 Resultados de extracción de ADN.

Tabla 13: Concentraciones de ADN cuantificadas en NanoDrop mediante las 4 diferentes técnicas de extracción.

Especie	Concentración de ADN			
	Invitrogen	Roche	Ebullición	Choque térmico
<i>Candida albicans</i>	84,3	40,2	12,1	70,6
<i>Candida auris</i>	125,1	25,7	2,0	27,9
<i>Candida glabrata</i>	136,9	50,4	5,6	45,5
<i>Candida guilliermondii</i>	133,7	12,8	17	38,3
<i>Candida krusei</i>	72,6	27,0	13,8	18
<i>Candida parapsilosis</i>	118,9	120,5	60,5	7,1
<i>Candida tropicalis</i>	81,4	14,5	10,1	13,7

Elaborado por Christian Rosales, 2018

Además utilizando los datos obtenidos en la relación entre las ondas 260/280 se determinó la pureza de la extracción, la cual se debe encontrar en un rango ideal de 1.8-2 para considerarse pura, como se puede observar en la tabla 12. Con esta información se determinó que el método de extracción comercial de Invitrogen fue el que presentó mejor

rendimiento en sus muestras al momento de realizar extracción de ADN sin el uso de Liticasa en cuanto a calidad y concentración.

Tabla 14: *Relación 260/280 de las muestras de ADN cuantificadas en NanoDrop mediante las 4 diferentes técnicas de extracción de ADN.*

Especie	Relación 260/280			
	Invitrogen	Roche	Ebullición	Choque térmico
<i>Candida albicans</i>	1.87	1.25	1.07	2.30
<i>Candida auris</i>	1.77	1.80	1.59	1.32
<i>Candida glabrata</i>	1.95	1.67	2.40	1.44
<i>Candida guilliermondii</i>	2.06	1.18	1.62	2.09
<i>Candida krusei</i>	1.77	2.30	0.81	1.26
<i>Candida parapsilosis</i>	1.89	1.90	1.70	2.20
<i>Candida tropicalis</i>	1.60	2.10	1.52	1.13

Elaborado por Christian Rosales, 2018

Mediante electroforesis en gel de agarosa se determinó la calidad cualitativa del ADN como se muestra en la Figura 8, en la que se observó que los dos métodos comerciales fueron los únicos en los que se logró presenciar bandas de ADN y se estableció que además, el método de Invitrogen presentaba un rendimiento mayor en cuanto a la calidad de las bandas de ADN, por lo que en el presente estudio se decidió trabajar únicamente con el ADN de cepas extraídas por este método.

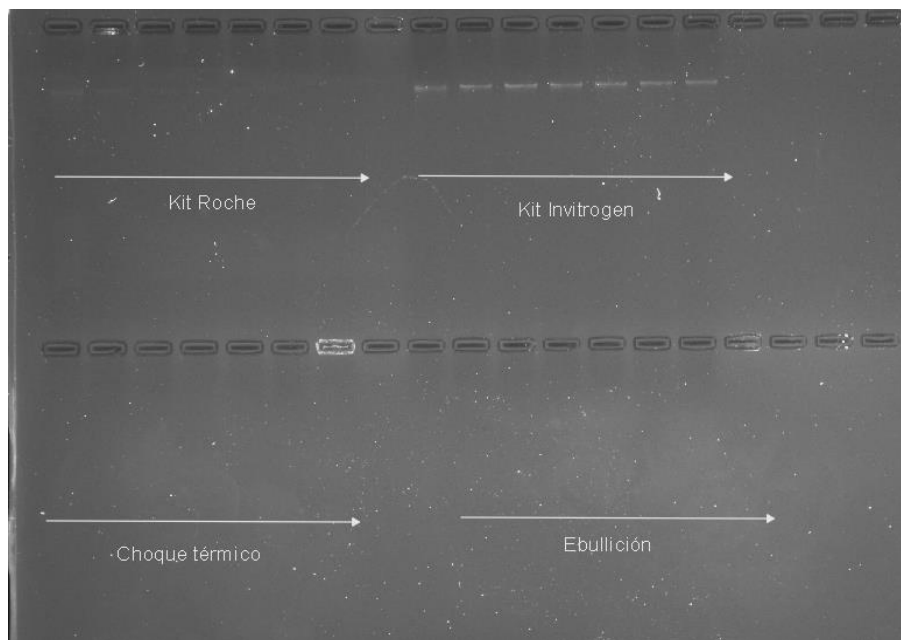


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa al 2% por 90 minutos a 80 Voltios de muestras de 7 especies de *Candida* extraídas por 4 diferentes métodos.

4.1.3 Resultados de pruebas moleculares

4.1.3.1 Estandarización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Multiplex.

Para *Candida albicans* se determinó que los *primers* están en la capacidad de identificar correctamente esta especie a cualquiera de las temperaturas anteriormente probadas, como se observa en la figura 9 (A); sin embargo, al subir la temperatura a 63°C no se observó la presencia de ninguna banda. Finalmente, se escogió la temperatura de 57° C por presentar una banda más estable, de buena intensidad y que corresponde al peso de 448 pb comparado con el marcador de peso molecular ubicado en el carril 1 de la figura 9 (A).

Los *primers* correspondientes a *Candida auris* pudieron determinar la especie correctamente en las temperaturas de 57° a 60°C, como se puede observar en los carriles 2-6 de la figura 9 (B); de la misma manera el peso de este amplicón se comparó con el marcador de peso molecular del carril 1 de la figura previamente descrita. Posteriormente, se escogió la temperatura de 57° C por presentar una banda intensa y que guardaba relación con la Tm de *Candida albicans*.

Al analizar los datos obtenidos con los *primers* de *C. glabrata* y *C. krusei* se corroboró que pueden detectar a la especie correctamente hasta los 60°C, como se observa en la figura 9 literales (C) y (E); mientras que los *primers* de *C. guilliermondii* presentaban bandas hasta 58 °C como se observa en el literal (D); por lo que se escogió a la temperatura de 57°C en la cual se obtenían bandas bien definidas y que además estaban relacionadas con las especies estandarizadas anteriormente.

En cuanto a *Candida parapsilosis* se determinó que los *primers* estuvieron en capacidad de detectar una banda clara hasta los 62°C como se observa en la figura 9 (F); por lo que finalmente, se determinó que la Tm adecuada era de 57°C. Para *Candida tropicalis*, se reveló mediante electroforesis que estos *primers* fueron capaces de detectar a dicha especie en las seis temperaturas probadas.

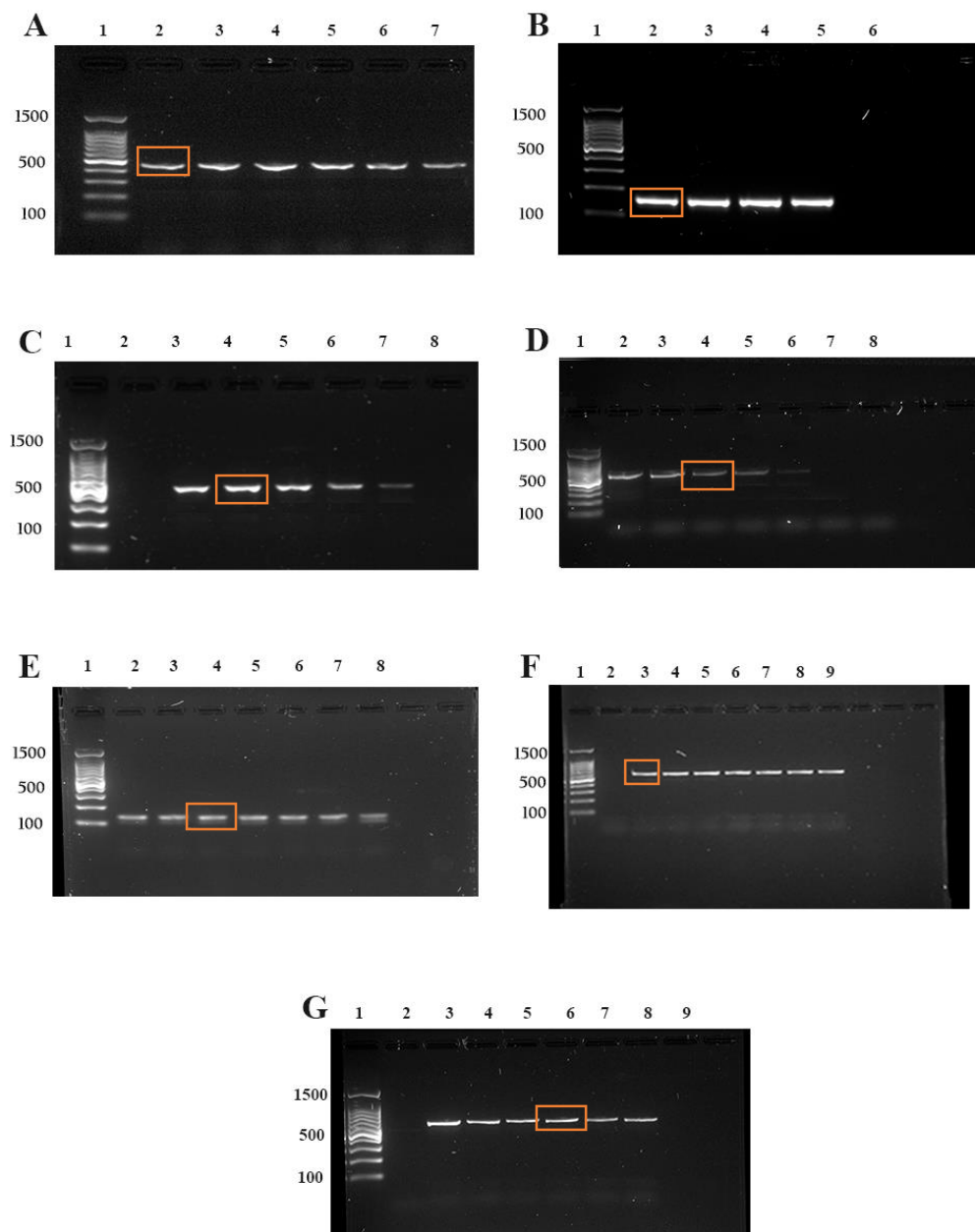


Figura 9 Gel de agarosa de los gradientes de temperatura utilizados para la identificación de las siete especies de *Candida*. (A) *Candida albicans*: 1, Ladder 100 pb; 2-7, gradiente de temperatura 57-62°C. (B) *Candida auris*: 1, Ladder 100 pb; 2-6, gradiente de temperatura 57-61°C. (C) *Candida glabrata*: 1, Ladder 100 pb; 2-8, gradiente de temperatura 55-61°C. (D) *Candida guilliermondii*: 1, Ladder 100 pb; 2-8, gradiente de temperatura 55-61°C. (E) *Candida krusei*: 1, Ladder 100 pb; 2-8, gradiente de temperatura 55-61°C. (F) *Candida parapsilosis*: 1, Ladder 100 pb; 2-9, gradiente de temperatura 56-63°C. (G) *Candida tropicalis*. 1, Ladder 100 pb; 2-9, gradiente de temperatura 53-60°C. Nota: La T_m escogida en el estudio se encuentra dentro del rectángulo naranja, **Elaborado por:** Christian Rosales, 2019

En la Tabla 15 se puede apreciar el programa de termociclado utilizado durante todo el proceso de la estandarización y que presentó un rendimiento óptimo con todos los *primers* utilizados.

Tabla 15: Programa de termociclado para la estandarización de la PCR multiplex.

Etapa	Programa de Termociclado
	30 Ciclos
Denaturación inicial (5min)	94 °C
Denaturación (30s)	94 °C
Hibridación (30s)	57 °C
Elongación (30s)	74 °C
Elongación final (10min)	74 °C
Enfriamiento	4°C

Elaborado por: Christian Rosales, 2018

Se observó que con las condiciones empleadas en la PCR multiplex se podía realizar una identificación válida de las diferentes especies de *Candida*, las cuales presentaban una banda definida y una diferencia en sus pesos moleculares ideal para diferenciarlas, como se puede observar en la figura 10.

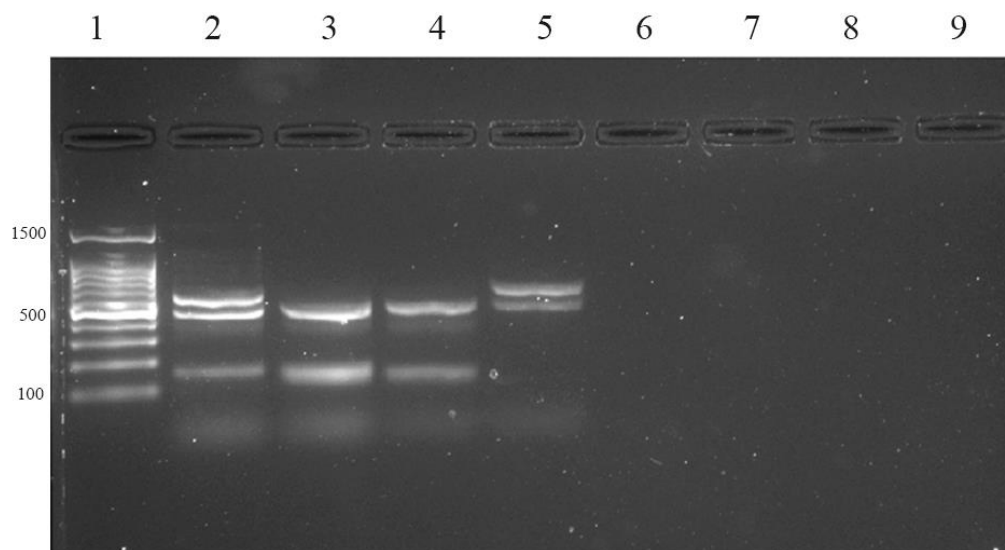


Figura 10: PCR multiplex. De mayor a menor peso molecular: 1: Ladder 100 pb; 2, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida krusei*; 3, *Candida albicans*, *Candida auris*; 4, *Candida glabrata*, *Candida auris*; 5, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*. **Elaborado por:** Christian Rosales, 2019

4.1.3.2 Resultados de especificidad de *primers*

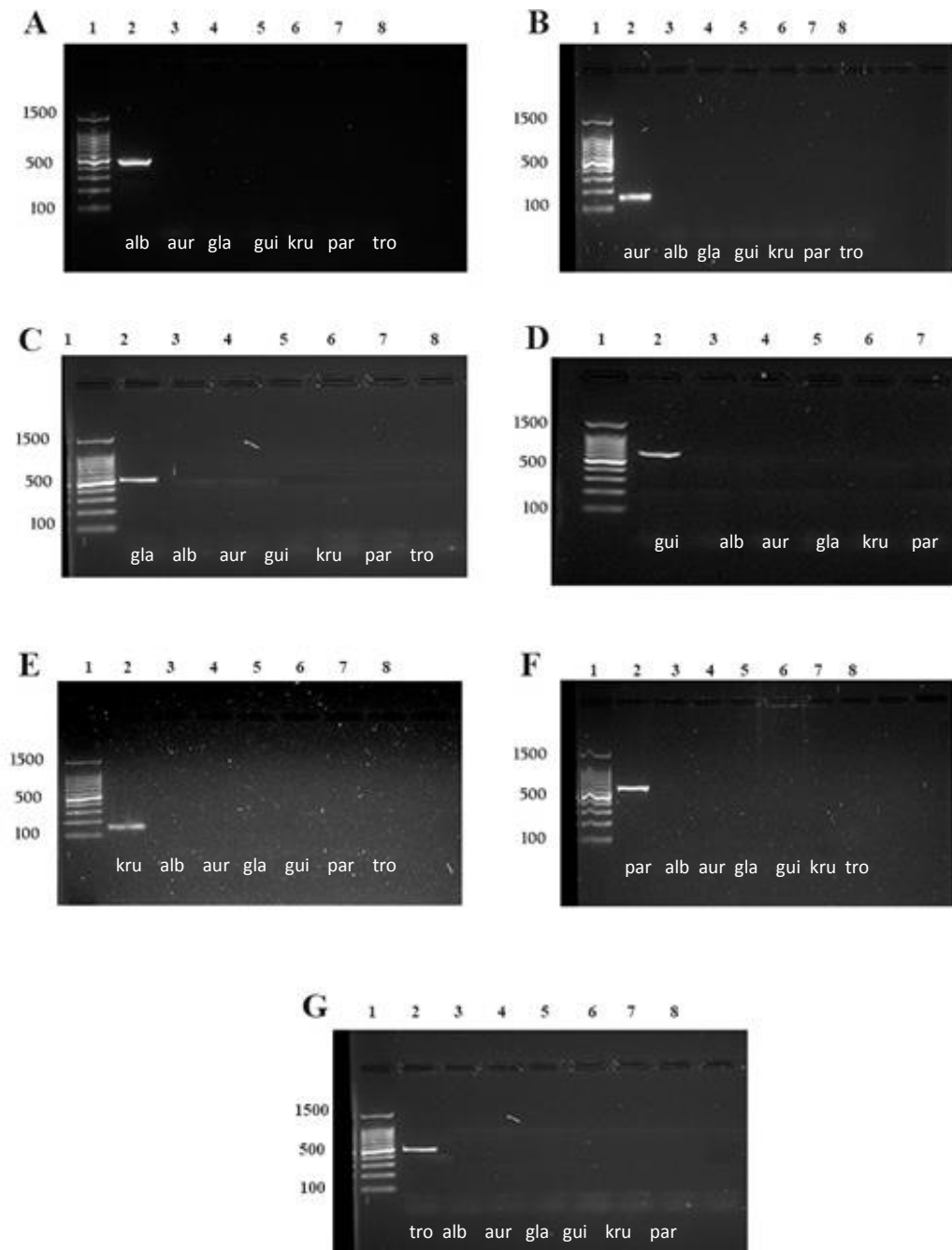


Figura 11: Determinación de la especificidad de cada par de *primers* (a) *Candida albicans* (b) *Candida auris* (c) *Candida glabrata* (d) *Candida guilliermondii* (e) *Candida krusei* (f) *Candida parapsilosis* (g) *Candida tropicalis*. Siglas: alb: *albicans*; aur: *auris*; gla: *glabrata*; gui: *guilliermondii*; kru: *krusei*; par: *parapsilosis*; tro: *tropicalis*. **Elaborado por:** Christian Rosales, 2019

Como se puede observar en la Figura 11, cada par de *primers* fue específico para la especie para la cual fueron diseñados, dando así como resultado que ninguno de estos presentó uniones inespecíficas ni formó bandas dímeros en el momento de realizar el protocolo con cada una de las siete especies de *Candida*.

4.1.3.3 Resultados de límite de detección

En la siguiente figura se puede observar las diluciones de ADN que fueron sometidas al proceso de PCR y con las que se obtuvieron los resultados del límite de detección, con la finalidad de conocer la última concentración en la cual la técnica era capaz de detectar y amplificar el ADN.

Para *Candida albicans*, *auris* y *glabrata*, la técnica fue capaz de detectar hasta la dilución número 9 que corresponde a la concentración de 0,004 ng/uL, esto nos indica que para estas especies el ADN requerido para obtener una amplificación positiva es extremadamente bajo y sería muy útil en instancias iniciales de la infección por *Candida*.

En cuanto a *Candida guilliermondii* y *krusei*, la técnica fue capaz de amplificar el ADN hasta la dilución número 8 que en este caso corresponde a 0,008 ng/uL de ADN, lo que representa una concentración mínima de ADN requerido para cumplir con el protocolo; a pesar de *Candida krusei* presentaba bandas en diluciones posteriores, estas no se observaron claras por lo que se decidió no tomarlas en cuenta en el proceso de determinación del límite de detección. Al igual que *Candida tropicalis* cuya última concentración detectada fue de 0,016 ng/uL, como se observa en la Figura 12.

Finalmente con *Candida parapsilosis*, la técnica amplificó hasta la dilución número 6 que significa una concentración de 0,32 ng/uL de ADN. La cantidad sigue siendo mínima sin embargo, esta especie es la que mayor concentración requirió para obtener un resultado positivo. Por consiguiente se determinó que la técnica de PCR multiplex era capaz de detectar en conjunto a todas las especies hasta la dilución correspondiente a 0,032 ng/uL. Exponiendo así bandas claras para cada una de las especies.

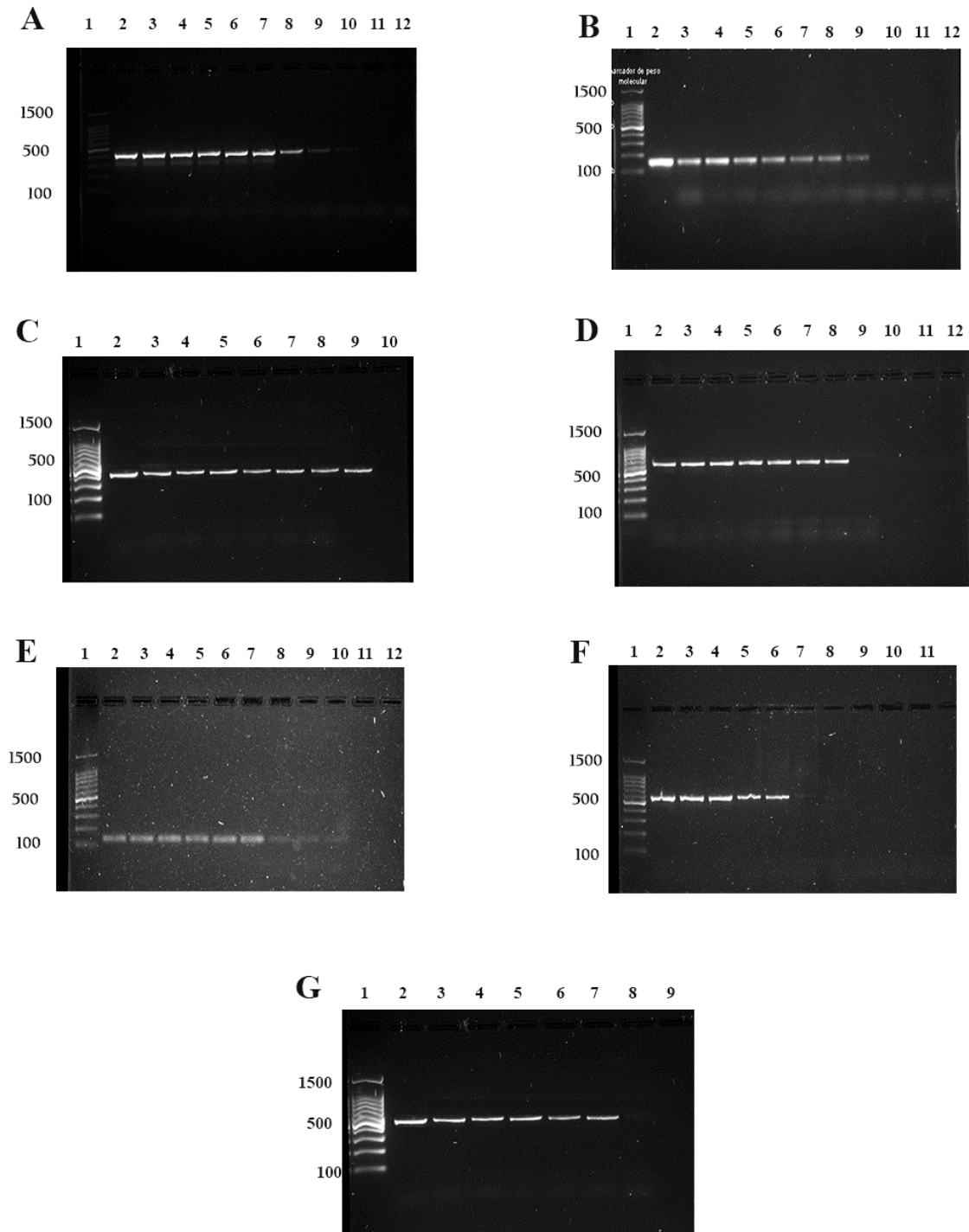


Figura 12: Determinación del Límite de detección para cada especie. (a) *Candida albicans*: 1, Ladder 100 pb; 2-12, diluciones de ADN (b) *candida auris*: 1, Ladder 100 pb; 2-12, diluciones de ADN (c) *Candida glabrata*: 1, Ladder 100 pb; 2-10, diluciones de ADN (d) *Candida guilliermondii*: 1, Ladder 100 pb; 2-12, diluciones de ADN (e) *Candida krusei*: 1, Ladder 100 pb; 2-12, diluciones de ADN (f) *Candida parapsilosis*: 1, Ladder 100 pb; 2-12, diluciones de ADN (g) *Candida tropicalis*: 1, Ladder 100 pb; 2-9, diluciones de ADN **Elaborado por:** Christian Rosales, 2019

A continuación, se determinó que el límite de detección de la técnica es de 0.032 ng/uL, concentración en la cual, la técnica es capaz de detectar a todas las especies mediante una banda bien definida y sin errores. A pesar de que para diferentes especies la técnica pudo amplificar el ADN a menores concentraciones, se tomó en cuenta la última concentración en la cual identifica a todas como un solo grupo, es decir la dilución número 6 correspondiente al valor antes mencionado, como se observa en la Figura 12 y 13.

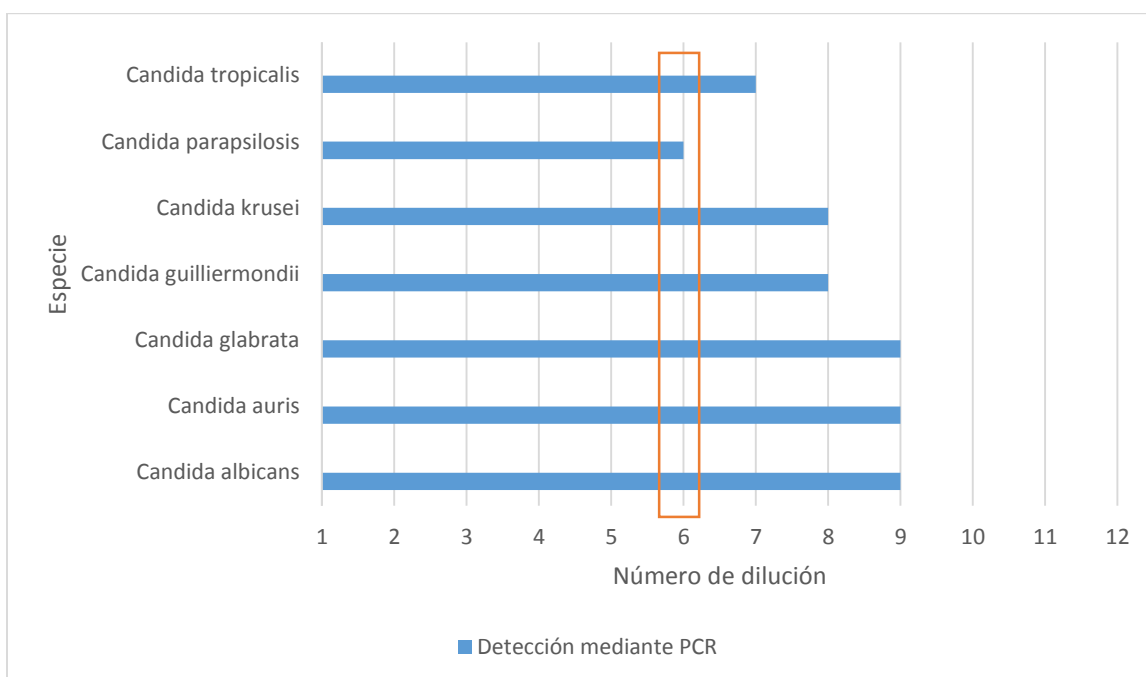


Figura 13: Representación de la última dilución detectable mediante la técnica de PCR Multiplex.

Fuente: Investigación. **Elaborado por:** Christian Rosales, 2019

4.1.3.4 Algoritmo de trabajo para la PCR multiplex

Con todos los datos obtenidos previamente se decidió elaborar un algoritmo de trabajo para facilitar el desarrollo de la técnica en el laboratorio, así como evitar errores analíticos durante todas las fases de la identificación de las especies de *Candida*. Este algoritmo se presenta a continuación en la Figura 14

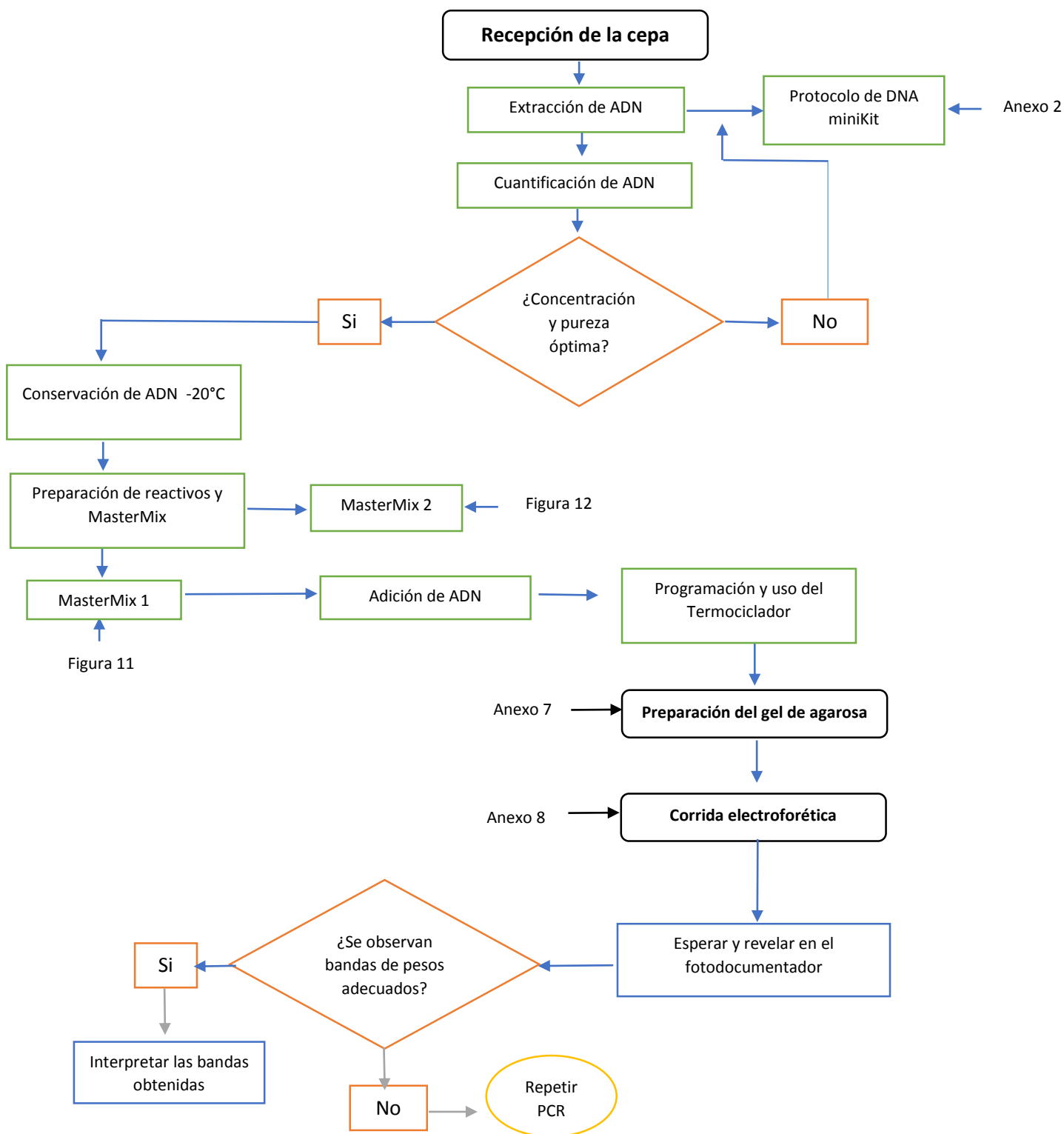


Figura 14: Algoritmo de Trabajo para la PCR Multiplex de Candida **Elaborado por:** Christian Rosales, 2019

CAPÍTULO V

5.1 DISCUSIÓN

La extracción de ADN de *Candida* a pesar de ser complicada debido a la capa de ergosterol que posee, se la puede realizar utilizando la enzima Liticasa; sin embargo, su costo puede llegar a ser demasiado alto para diferentes laboratorios.

El método de extracción por choque térmico descrito por Caprilesa, 2005; consta de una serie de cambios de temperatura al inicio de la extracción para romper la capa de ergosterol, como resultado se obtiene ADN suficiente para la realización de una PCR (Caprilesa et al., 2005), estos resultados difieren de lo obtenido en el presente estudio, en el cual al aplicar la metodología propuesta previamente se logró recuperar una buena concentración determinada por el NanoDrop, pero no se observaron bandas de ADN al correr la electroforesis, por lo que se determinó que la calidad del ADN extraído no era la óptima para el trabajo en el laboratorio.

Los datos presentados concuerdan con el estudio de Gutcovsky, 2008; en el cual se compararon diferentes métodos de extracción de ADN de *Candida*, se obtuvieron como resultados que el método de choque térmico no era el más efectivo debido a su baja calidad, y se proponía como alternativa la extracción con el uso de perlas de vidrio, que, a pesar de ser más fácil tiene un costo sumamente elevado (Gutcovsky, 2008).

Las condiciones de trabajo utilizadas suelen tener variaciones dependiendo de las necesidades del sitio donde sea empleada la técnica; por ejemplo, la concentración de *primers* en la presente estandarización fue de 0,1 μM con la cual se obtuvo amplificaciones y bandas claras; estos resultados difieren de lo publicado por Carvalho, y colaboradores en el año 2007, estudio en el cual se describe una concentración de *primers* que varían entre 0.15 a 0.5 μM para un desempeño óptimo de la técnica; al igual que la cantidad de ADN que se empleó para la reacción de PCR difiere del mencionado estudio en el cual el ADN con el que se trabajó tenía una concentración de 0.10 μL de ADN, mientras que en el presente estudio la cantidad fue de 1-2 μL , con lo cual se determinó que dicha cantidad de ADN era suficiente para amplificar cada una de las especies. Esta cantidad de ADN utilizado también fue descrita por Rad y colaboradores en el año 2012 en su trabajo; cabe

recaltar que los *primers* utilizados en el estudio mencionado fueron diferentes a los utilizados en este análisis. Sin embargo, se mantuvo las mismas concentraciones de Taq Polimerasa que se presentan sus respectivos estudios. (Mahmoudi Rad, Zafarghandi, Amel Zabihi, Tavallaei, & Mirdamadi, 2012)

El desarrollo del protocolo de trabajo se adecuaron al termociclador que posee el laboratorio de Investigación de la Carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, se mantuvo el tiempo de activación de la Taq del estudio base publicado por Carvalho y colaboradores, en el cual este paso es realizado durante 10 minutos (Carvalho et al., 2007); sin embargo, la publicación posterior elaborada por García, 2017 determina que una activación inicial de 5 minutos era suficiente para activar la enzima Taq Polimerasa (García et al., 2017); experimentalmente se comprobó que al utilizar dicho procedimiento no se observaban amplificaciones, por lo que se estableció que era necesario mantener los 10 minutos la denaturación para obtener bandas definidas de ADN en la electroforesis; a diferencia de esto, el tiempo de elongación final se mantuvo en 10 minutos a 74°C; por otro lado el número de ciclos se modificó disminuyendo de 40 a 30 debido a que cuando trabajó a 40 ciclos se presentaron dímeros de ADN con un peso de 600 pares de base cuando se analizaba a *Candida albicans*; dicho error podría llevar un resultado falso positivo con *Candida glabrata*.

La especificidad de la reacción en cadena de la Polimerasa Multiplex se determinó realizando pruebas moleculares utilizando un primer específico de cada especie pero con ADN de todas las especies analizadas en este estudio así como lo estableció García et al; sin embargo en dicho estudio las concentraciones de ADN utilizadas oscilaban entre 20 y 80 ng, mientras que las concentraciones de los aplicados en este estudio fueron entre 50 y 100 ng; dicho cambio podría influir en las reacciones de especificidad debido a que no se ha determinado un valor de concentración de ADN fijo con el cual trabajar.

Los resultados de especificidad tienen relación con lo publicado por Colom y colaboradores en el año 2006; donde detalla que las reacciones de PCR necesitan tener alta especificidad, en el momento del diseño de *primers* para evitar amplificaciones cruzadas que concluyan con resultados interpretados erróneamente mediante el analista. (Colom, Jover, & Ferrer, 2006) Lo expuesto anteriormente concuerda con el estudio de Camacho-Cardoso, 2017;

donde se postula que los métodos moleculares tienen una especificidad más alta que los métodos fenotípicos de identificación para levaduras, debido al uso de secuencias específicas de ADN. (Camacho-Cardoso et al., 2017)

En cuanto al límite de detección, la metodología aplicada en este estudio tiene una mayor capacidad de identificación a concentraciones más bajas, esta técnica detecta hasta concentraciones de ADN de 0,032 ng/uL en comparación con la metodología desarrollada por García et al, 2017, en la cual exponen que se logró detectar concentraciones de hasta 12,5 ng/uL; esto nos indica que el presente trabajo tiene alta sensibilidad a concentraciones bajas de ADN lo que permitiría el uso del presente protocolo aun cuando existan concentraciones mínimas de ADN, como es el caso de las candidemias, donde, se encuentran concentraciones casi indetectables de ADN de *Candida* (Pascual & Cortés, 2011). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que el estudio no ha sido aplicado a muestras provenientes de seres humanos, por lo que se requería realizar un estudio complementario para comparar el límite de detección.

A pesar de que la concentración de ADN que puede utilizarse en la aplicación de esta metodología es mínima, se debe tomar en cuenta también la pureza del ADN extraído, como lo menciona Osorio et al, 2009 en el estudio donde recalcan que a pesar de haber tenido concentraciones de ADN que oscilaban entre 50-100 ng/uL, era necesario realizar la determinación de la pureza del mismo mediante la relación 260/280 obtenida mediante el uso de NanoDrop; en el presente estudio se dio prioridad a las muestras que obtuvieron un valor de pureza entre 1,8-2; no obstante, también se utilizaron muestras de ADN de *Candida tropicalis* y *Candida auris* cuyo valor de pureza fue de 1,6 y 1,77 respectivamente; por lo que se puede afirmar que a pesar de que la pureza es un factor importante al momento de extraer ADN, es posible utilizar muestras que no se encuentren en el rango preestablecido de 1,8-2. . (Osorio, David, Ramírez, López, & Mambuscay, 2009)

5.2 CONCLUSIONES

En la evaluación de las técnicas de extracción de ADN a partir de cepas de *Candida* sin el uso de Liticasa se determinó que de las cuatro metodologías utilizadas, la que tuvo un mejor rendimiento en cuanto a la cuantificación de la concentración de ADN junto con la presencia de bandas reveladas mediante electroforesis que permitieron la observación de un ADN sin degradarse fue el método comercial de la marca Invitrogen “Pure Link DNA Mini Kit”, seguido por el método comercial de Roche que presentó bandas menos claras; al utilizar los métodos caseros no se obtuvo una buena concentración ni bandas en el gel de electroforesis.

En cuanto a la estandarización de la reacción en cadena de la Polimerasa para la identificación de las especies de *Candida*, se estableció en dos reacciones las condiciones adecuadas para una correcta identificación de las especies con la finalidad de evitar confusiones en la interpretación de las bandas en el gel de electroforesis. Individualmente se comprobó mediante geles de electroforesis que cada *primer* fue específico para la identificación de la especie para la cual fue elaborado; con esto se evidenció que no van a existir resultados falsos positivos y se aseguró que cada identificación corresponde verdaderamente a una especie específica.

El límite de detección de la técnica se determinó mediante diluciones de ADN y se corroboró que el procedimiento estandarizado previamente es capaz de amplificar correctamente hasta una concentración de ADN 0.032 ng/μL lo que corrobora la eficacia de la técnica para detectar y amplificar los productos frente a concentraciones muy bajas de ADN, lo que facilita la identificación del microorganismo en etapas tempranas de la infección facilitando así un tratamiento adecuado por parte del médico.

5.3 RECOMENDACIONES

Para la extracción de ADN se recomienda la evaluación de las mismas metodologías utilizadas en este estudio pero con el uso de Liticasa que puede llegar a ser esencial en la extracción de ADN con los métodos in-house, debido a que en estos no se utilizan soluciones de lisado o de purificación comparados con los métodos comerciales.

Se propone dar continuación a este estudio con la evaluación de la metodología presentada, utilizando cepas de *Candida* aisladas de muestras recolectadas a nivel hospitalario o en centros de salud con la finalidad de determinar la eficacia y sensibilidad de este método.

En cuanto a la mejora y evolución de esta técnica sería conveniente la ampliación de las especies identificables mediante la integración y estandarización de más *primers* que identifiquen otras levaduras del género *Candida*, esto ayudaría a extender el rango de identificación de esta metodología.

De igual manera, es necesario un estudio comparativo entre el método molecular utilizado en este estudio y los métodos manuales como el auxonograma o métodos automatizados que son los más utilizados actualmente en nuestro medio como el caso de Vitek o Phoenix, así se podrá determinar qué método tiene un mejor desempeño con las cepas en nuestro país.

Debido al incremento del uso de las técnicas moleculares es recomendable la aplicación de otra técnica que permita evaluar la sensibilidad de las levaduras del género *Candida* frente a los diferentes antimicóticos utilizados para el tratamiento de las infecciones, así como los mecanismos de resistencia que presentan las mismas.

En cuanto al límite de detección, es prudente realizar un estudio centrado en el desempeño de la técnica aplicada a diferentes métodos de extracción de ADN con muestras provenientes de diferentes zonas corporales.

BIBLIOGRAFÍA:

- Andrade, M. (2014). Identificación de las especies del género *Candida* vulvovaginal en gestantes que acuden al Hospital Gineco-obstétrico Dr. Jaime Sánchez, 210–257.
- Antonio Ciudad-Reynaud. (2015). Infecciones Vaginales Por *Cándida*: Diagnóstico Y Tratamiento, 159–166. Retrieved from http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ginecologia/vol53_n3/pdf/a04v53n3.pdf
- Ballesté, R., Ballesté, D. R., Arteta, Z., Fernández, N., Mier, C., Mousqués, N., ... Gezuele, E. (2005). Evaluación del medio cromógeno CHROMagar *Candida* TM para la identificación de levaduras de interés médico.
- Ballesté, R., Mousqués, N., & Gezuele, E. (2003). Onicomycosis. Revisión del tema. *Rev Med Uruguay*, 19, 93–106. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00689.x>
- Camacho-Cardoso, J. L., Martínez-Rivera, M. Á., Manzano-Gayosso, P., Méndez-Tovar, L. J., López-Martínez, R., & Hernández-Hernández, F. (2017). Detección molecular de especies de *Candida* en especímenes de pacientes hospitalizados. *Gaceta Medica de Mexico*, 153(5), 581–589. <https://doi.org/10.24875/GMM.17002535>
- Caprilesa, H. De, Waard, D., Teresa, M., Caprilesa, C. H. De, Mata-essayag, S., & Abate, T. (2005). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199416579011>.
- Carvalho, A., Martins, M. L., Rodrigues, A. G., & Ludovico, P. (2007). Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species, (November 2007), 619–627. <https://doi.org/10.1080/13693780701501787>
- Cervera, C. (2012). Candidemia y candidiasis invasora en el adulto . Formas clínicas y tratamiento &, 30(8), 483–491. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.02.003>
- Colom, M. F., Jover, A., & Ferrer, C. (2006). [Molecular biology in the diagnosis of deep-seated candidiasis in the critically ill non-neutropenic patient]. *Rev Iberoam Micol*, 23(1), 26–28. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(06\)70008-0](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(06)70008-0)
- Cuesta, F. S. (n.d.). Identificación de levaduras, (Capítulo 3), 1–20.

- Dickinson, B. (2014). BBL CHROMagar Candida Medium, (July), 1–4.
- Duque, C. M., Uribe, O. L., Soto, A. F., & Alarcón, J. (2009). Vulvovaginal candidiasis in a group of pregnant women from Medellín. *Asociación Colombiana de Infectología*, 13(1), 14–20. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(09\)70139-0](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(09)70139-0)
- Estrada-barraza, D., Dávalos, A., Flores-padilla, L., Elias, R. M., & Octavio, L. (2011). Revista Iberoamericana de Micología Comparación entre métodos convencionales , ChromAgar Candida ® y el método de la PCR para la identificación de especies de Candida en aislamientos clínicos &, 28(1), 36–42.
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.11.003>
- Ferrara, G., & Reviakina, V. (2014). Estudio comparativo entre los sistemas automatizados Vitek YBC ® y Microscan Walk Away RYID ® con los métodos fenotípicos convencionales para la identificación de levaduras de interés clínico ., (December).
- Forastiero, A., Monteiro, M. C., Jordan, R., Agorio, I., & Mellado, E. (2015). Rapid Development of Candida krusei Echinocandin Resistance during, 59(11), 6975–6982. <https://doi.org/10.1128/AAC.01005-15.Address>
- García, L. T., Luna, L. J., Velasco, T. K., Guerra, B. E., García, L. T., Luna, L. J., ... Guerra, B. E. (2017). A new multiplex PCR for species-specific diagnosis of human candidiasis. *Biomédica*, 37(2), 200–208. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3202>
- Guerrero, J. (2016). Identificación , susceptibilidad y distribución de especies de Cándida obtenidas de muestras clínicas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), de enero 2007 a abril 2016 .
- Gutcovsky, C. (2008). “Estudio Comparativo De Dos Técnicas De Extracción De Adn Genómico De Levaduras Del Género Candida Para Su Análisis Por Rapd-Pcr, 12–16.
- Höfs, S., Mogavero, S., & Hube, B. (2016). Interaction of Candida albicans with host cells : virulence factors , host defense , escape strategies , and the microbiota, 54(3), 149–169. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5514-0>
- Kordalewska, M. (2017). Rapid and Accurate Molecular Identification of the Emerging.

Journal of Clinical Microbiology, 55(8), 2445–2452.

- Kothavade, R. J., Kura, M. M., Valand, A. G., & Panthaki, M. H. (2010). *Candida tropicalis* : its prevalence , pathogenicity and increasing resistance to fluconazole, 873–880. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.013227-0>
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments, (April), 1–5. <https://doi.org/10.3791/3923>
- Mahmoudi Rad, M., Zafarghandi, A. S., Amel Zabihi, M., Tavallaee, M., & Mirdamadi, Y. (2012). Identification of candida species associated with vulvovaginal candidiasis by multiplex PCR. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2012(May 2014). <https://doi.org/10.1155/2012/872169>
- Mensa, J., Almirante, B., María, J., Ruiz-camps, I., Mu, P., Vázquez, L., ... Seimc, D. (2011). Recomendaciones sobre el tratamiento de la candidiasis invasiva y otras infecciones por levaduras de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2011, 29(5), 345–361. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.01.008>
- Miró, M. S. (2016). . Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos. Retrieved from https://www.clinicalkey.es/service/content/pdf/watermarked/1-s2.0-S1130140617300281.pdf?locale=es_ES
- Morschhäuser, J. (2002). The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1587(2–3), 240–248. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(02\)00087-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(02)00087-X)
- MSP. (2014). Diagnóstico y tratamiento de la infección vaginal. Retrieved from [http://instituciones.msp.gob.ec/documentos/Guias/guias 2014/GPC Infeccion_vaginal_obstetrica.pdf](http://instituciones.msp.gob.ec/documentos/Guias/guias%2014/GPC%20Infeccion_vaginal_obstetrica.pdf)
- Ombrella, A. M., & Racca, L. (2008). Actividades proteínasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH, 12–16.
- Örnemark, “B. Magnusson and U. (2014). *La Adecuación al Uso de los Métodos*

Analíticos.

- Osorio, David, E., Ramírez, M., López, W. A., & Mambuscay, L. A. (2009). Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Revista Colombiana de Biotecnología.*, *XI*(1), 125–131.
<https://doi.org/10.1007/s11947-009-0290-z>
- Pascual, W., & Cortés, J. (2011). Diagnóstico molecular de candidemia mediante PCR semianidada en pacientes críticos Molecular diagnosis of candidemia by semi- nested PCR in critically ill patients, *36*(3), 135–140.
- Pasqualotto, A. C., Graciela, A., Antunes, V., & Severo, L. C. (2006). *Candida guilliermondii* AS THE AETIOLOGY OF CANDIDOSIS, *48*(3), 123–127.
- Patel, S. V, Bosamia, T. C., Bhalani, H. N., Singh, P., & Kumar, A. (2015). Polymerase Chain Reaction (PCR), (February).
- Ramos, A. P., & Desgarennnes, C. P. (2005). Factores de virulencia en, 12–27.
- Rodríguez, T. L., Zhurbenko, R., Martínez, C. R., Zayas, Y., & Rodríguez, A. (2010). Identificación de especies de *Candida* de importancia clínica con un método auxonograma modificado, *2*(1), 48–57.
- Sanabria, R. I., & Samudio, M. et al. (2014). Perfil de susceptibilidad a anti fúngicos de aislados de *Candida* spp por el método de microdilución . Nuevos puntos de cortes para fluconazol Anti-fungal susceptibility profile of *Candida* spp isolates by the microdilution method . New cutoff points for fl. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, *12*(1), 33–40.
- Tapia, C. (2008). Candidiasis Vulvovaginal Jack D Sobel . *Rev Chil Infect*, *25*(4), 2008.
- Tapia, M. (2015). “determinación de la resistencia y sensibilidad de cándida al fluconazol en muestras de secreción faríngea en pacientes con vih/sida en el hospital “CARLOS ANDRADE MARÍN” durante el período de enero a junio del 2015.
- Theill, L., Dudiuk, C., Morano, S., Gamarra, S., Nardin, M. E., Mendez, E., & Garcia-Effron, G. (2016). Argentina Prevalencia y sensibilidad a los antifúngicos de *Candida*

albicans y sus especies relacionadas, *Candida dubliniensis* y *Candida africana* aisladas de muestras vulvovaginales en un hospital de Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.10.003>

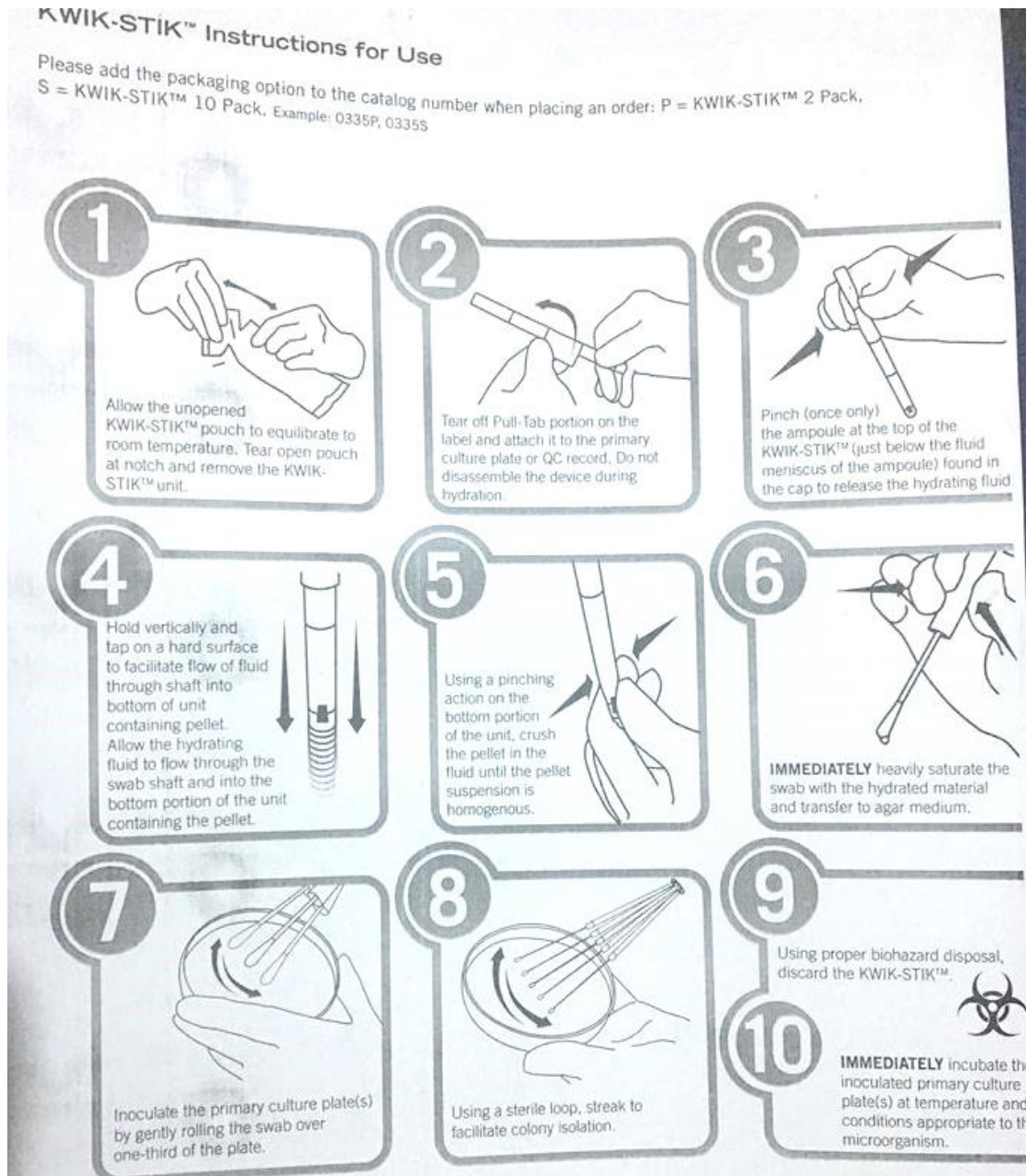
Torres-rodríguez, J. M., & Morera, Y. (2010). *Candida glabrata*: un patógeno emergente.

Velasco, E. (n.d.). Candidiasis oral en un paciente pediátrico.

Villalobos, J. M. (2011). *Candida parapsilosis*: principal causa de candidemia en un hospital de referencia para adultos de Costa Rica, 159–165.

ANEXOS

Anexo 1: Protocolo para resuspender las cepas ATCC



Anexo 2: Protocolo de extracción de ADN mediante el kit comercial Roche

Preparación de reactivos:

- Proteinasa K + 4,5 mL de agua grado molecular
- Buffer de inhibición + 20 mL etanol
- Wash solution + 80 mL etanol

Extracción:

- Precalentar a 70° C el buffer de elución (200 uL por muestra a extraer)
- En tubo eppendorf colocar 200 uL de muestra previamente homogenizada
- Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm
- Retirar el sobrenadante y dejar el botón
- Agregar 200 uL de PBS y mezclar
- Agregar 200 uL de binding buffer y 40 uL de Proteinasa K
- Incubar por 20 minutos a 70°C
- Agregar 100 uL de isopropanol
- Centrifugar un minuto
- Pasar todo a los tubos con filtro incluidos en el kit
- Colocar el tubo de recolección por debajo
- Centrifugar 1 minuto a 8000 rpm
- Descartar el tubo de recolección y colocar uno nuevo
- Colocar 500 uL de buffer de inhibición
- Centrifugar 1 minuto a 8000 rpm
- Descartar el tubo de recolección y colocar uno nuevo
- Agregar 500 uL de Wash solution
- Centrifugar 1 minuto a 8000 rpm
- Descartar el contenido del tubo de recolección y volver a utilizarlo
- Realizar un nuevo lavado
- Descartar el tubo de recolección
- Centrifugar el tubo con filtro para eliminar desecho de la solución de lavado
- Colocar el tubo que posee el filtro con un nuevo tubo eppendorf previamente rotulado

- Agregar 200 uL de elution buffer
- Reposar por 2 minutos
- Centrifugar 1 minuto a 8000 rpm
- El nuevo tubo eppendorf contiene el ADN extraído.

Anexo 3: Protocolo de extracción de ADN mediante el método casero de choque térmico

Preparación de materiales:

- Preparar 100 mL de buffer TE 1x
- Pre calentar el bloque térmico a 100 °C
- Colocar la ultracongeladora a -80 °C

Procedimiento

- Colocar una colonia de *Candida* aislada 24 horas antes en 500 uL de buffer TE 1x
- Centrifugar por 10 minutos a 13.000 revoluciones por minuto
- Descartar el sobrenadante
- Resuspender el sedimento en 300 uL de buffer TE 1x
- Colocar en el ultracongelador a -80 °C por 30 minutos
- Posteriormente colocar en un bloque térmico por 10 minutos
- Realizar este procedimiento 3 veces
- Centrifugar por 5 minutos a 400 revoluciones por minutos
- Colocar el sobrenadante en un tubo eppendorf estéril
- Almacenar el ADN a -20 °C hasta su uso

Anexo 4: Protocolo de extracción de ADN mediante el método casero de ebullición

Preparación de materiales:

- Preparar 100 mL de buffer TE 1x
- Precalentar el bloque térmico a 60 °C
- Preparar solución salina al 0.8%

Procedimiento:

- Resuspender las colonias de *Candida* en 500 uL de solución salina
- Centrifugar por 10 minutos a 13.000 revoluciones por minuto
- Eliminar el sobrenadante
- Reconstituir el precipitado con 200 uL de buffer TE 1X
- Agregar 40 uL de Proteinasa K
- Incubar a 60 °C por una hora
- Centrifugar 10 minutos a 13000 revoluciones por minuto
- Separar en un tubo eppendorf estéril el sobrenadante
- Incubar 15 minutos a 80 °C
- Centrifugar por 10 minutos a 13.000 revoluciones por minuto
- Colocar el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf con 200 uL de Buffer TE 1x.

Anexo 5: Protocolo de extracción de ADN mediante el kit comercial PureLink DNA Mini kit de Invitrogen

Preparación de materiales

- Proteinasa K + 5 mL de agua grado molecular
- Pre calentar el bloque térmico a 60 °C
- Wash Solution 1 + 50 mL de etanol absoluto
- Wash Solution 2 + 50 mL de etanol absoluto

Lisis

- Resuspender las levaduras en 180ul de *PureLink® Genomic Digestion Buffer*.
- Añadir 20 µL de *proteínasa K* y pasar brevemente por vortex.
- Incubar el tubo a 55 ° C previamente pasar por vórtex 1 minuto, hasta que la lisis esté completa (2 horas).
- Añadir 20 µL de *ARNasa A* al lisado, mezclar bien con vortex, e incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- Añadir 200 µl de Lisis *Genómica PureLink®* y mezclar bien por Vórtex para obtener una solución homogénea.
- Añadir 200 µl de etanol 96-100% al lisado. Mezclar bien con vortex durante 5 segundos para producir una solución homogénea.

Binding DNA

- Añadir el lisado 500µl preparado a la columna *PureLink® Spin*.
- Centrifugar la columna a 13.500rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Desechar el tubo de recolección y colocar la columna *PureLink® Spin* en un tubo de recolección nuevo.

Lavado de DNA

- Añadir 500 µl de tampón de lavado 1 preparado con etanol a la columna.

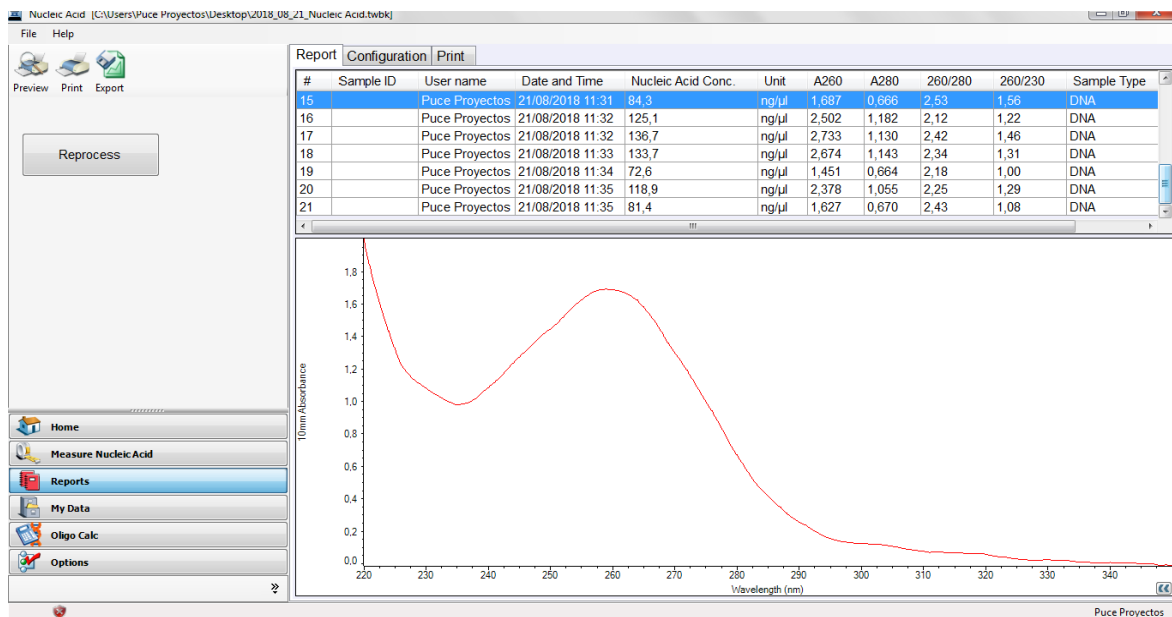
- Centrifugar la columna a temperatura ambiente a 13.500rpm durante 1 minuto.
- Deseche el tubo de recogida y coloque la columna de giro en un tubo limpio
- Añadir 500 µl de tampón de lavado 2 preparado con etanol a la columna.
- Centrifugar la columna a velocidad máxima durante 3 minutos
- Desechar el tubo de recogida.

Elución DNA

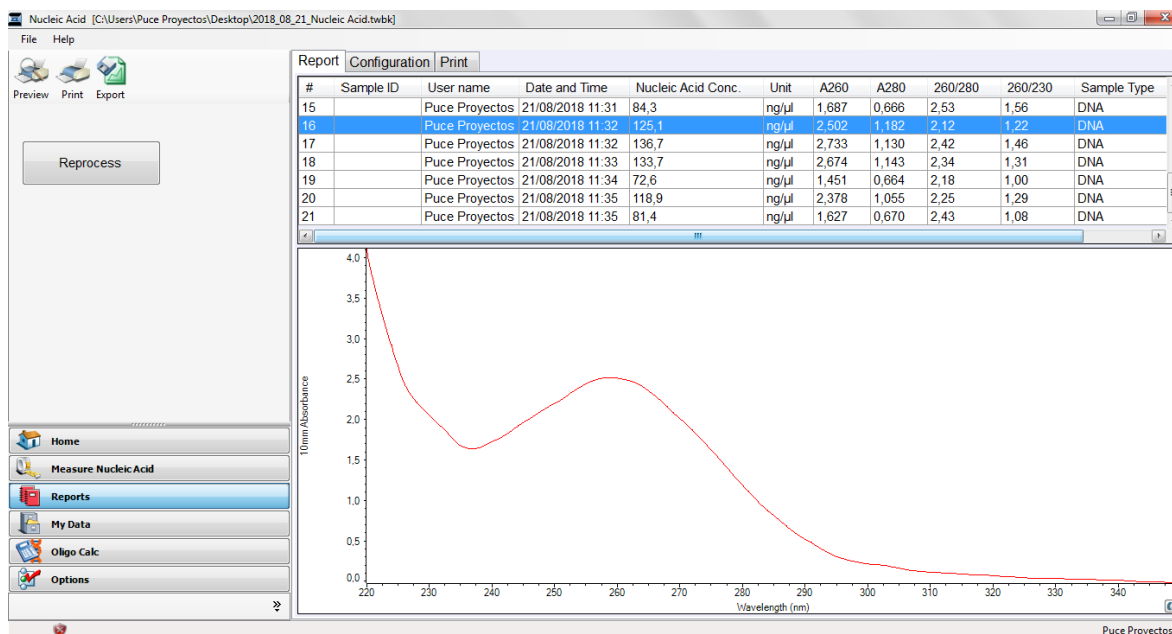
- Coloque la columna de centrifugación en un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml.
- Añadir 100 µl de PureLink® Genomic Elution Buffer a la columna.
- Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar la columna en Velocidad máxima durante 1 minuto a temperatura ambiente. El tubo contiene ADN genómico.
- Repetir el proceso con la misma columna en un nuevo tubo esteril de 1,5 ml para recuperar más ADN

Anexo 6: Cuantificaciones de ADN mediante NanoDrop 2000

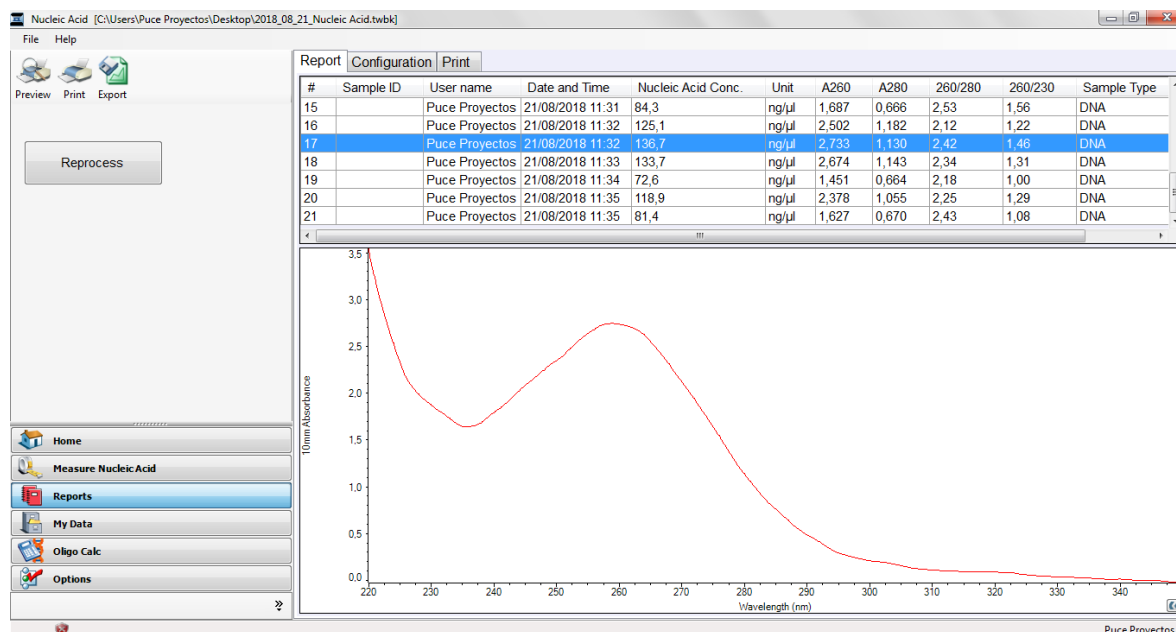
-ADN *Candida albicans*.



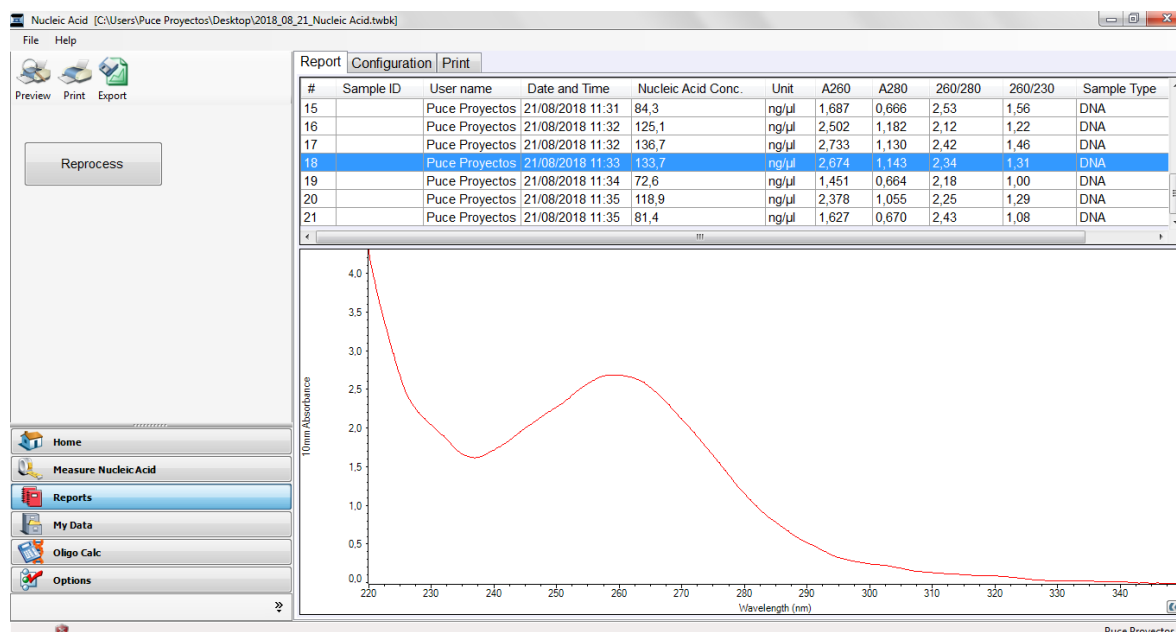
-ADN *Candida auris*.



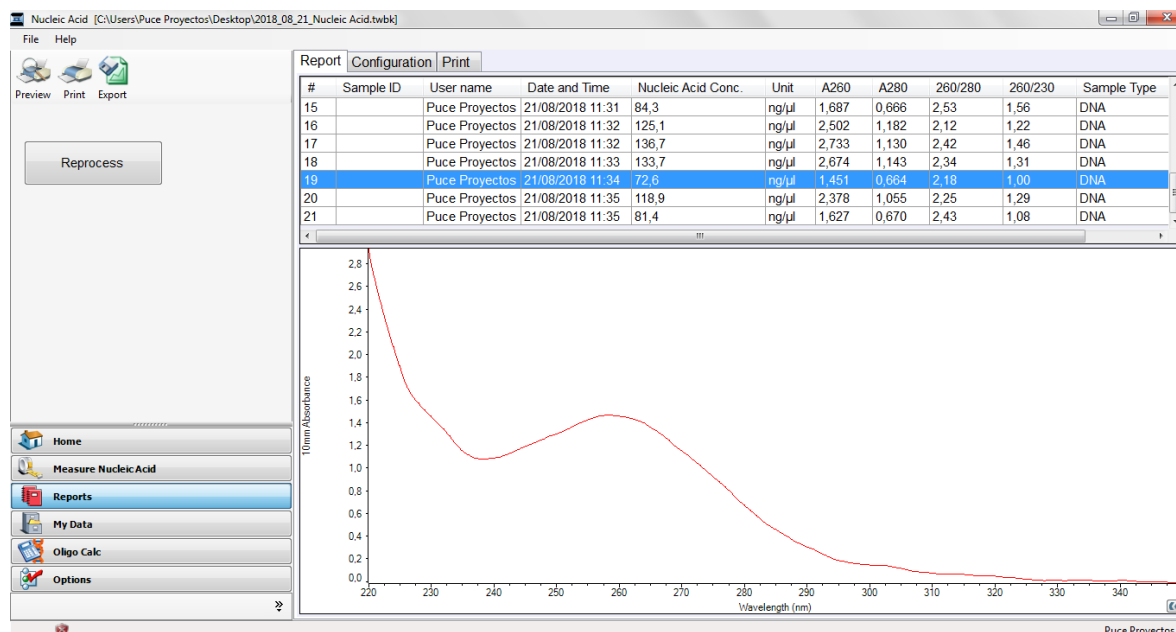
-ADN *Candida glabrata*.



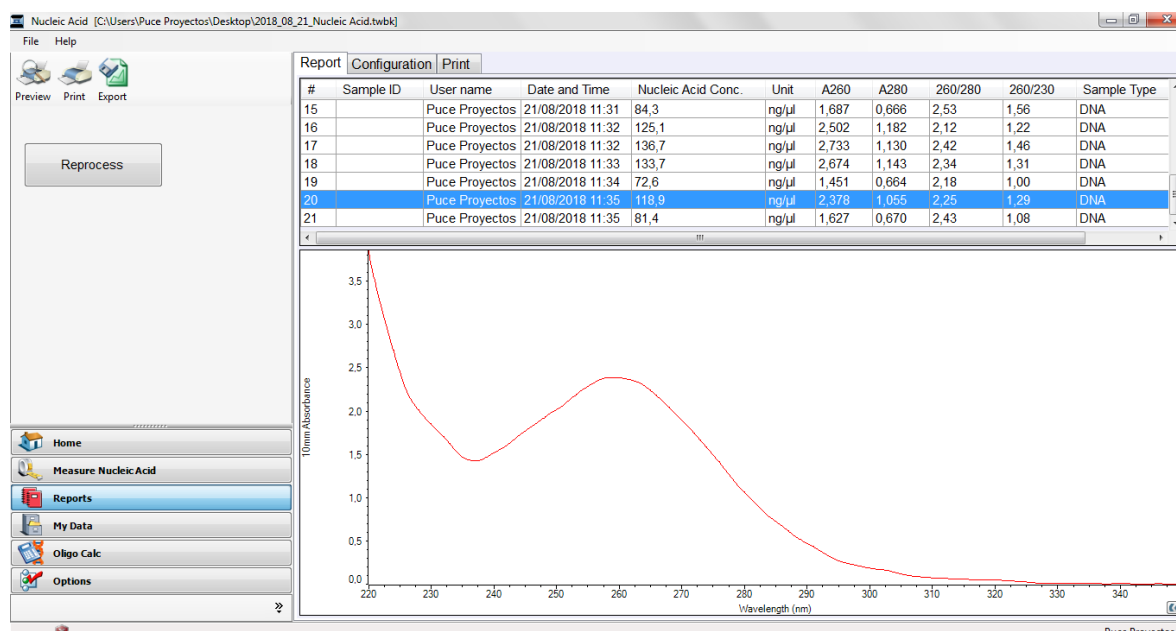
-ADN *Candida guilliermondii*.



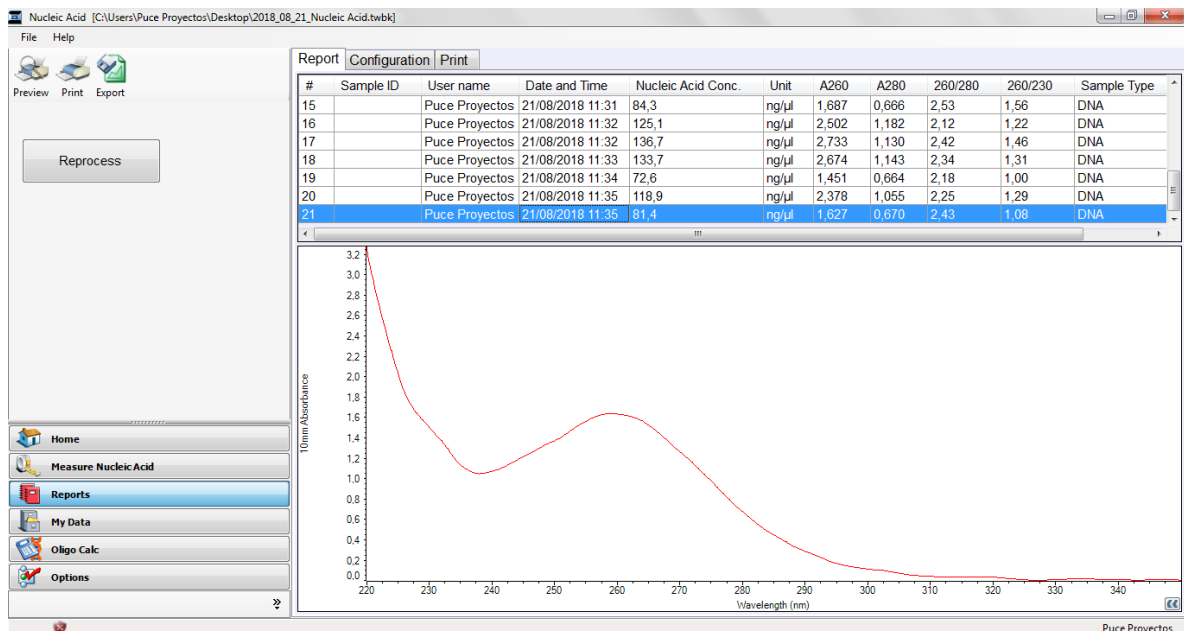
-ADN *Candida krusei*.



-ADN *Candida parapsilosis*.



-ADN *Candida tropicalis*.



Anexo 7: Protocolo de trabajo para la elaboración del gel de electroforesis al 2%

Materiales:

- Balanza
- Papel aluminio
- Agarosa
- TAE 1X
- Frascos de vidrios

Preparación:

- Pesar 1,2 gramos de polvo de agarosa en la balanza
- Filtrar 60 mL de TAE 1X y agregarlos al frasco de vidrio junto con la agarosa
- Colocar en el microondas 5 ciclos de 10 segundos hasta que se disuelva completamente
- Dejar entibiar
- Agregar 1 uL de agente intercalante
- Preparar la celda de electroforesis junto con los peines
- verter el contenido del frasco sin generar burbujas
- De producirse burbujas eliminarlas con una punta de pipeta
- Dejar solidificar por 15 minutos

Anexo 8: Protocolo de trabajo para la corrida de electroforesis.

- Llenar la mitad de la cámara de electroforesis con TAE 1X
- Colocar el gel previamente realizado, dentro de la cámara de electroforesis
- Cargar en el primer pocillo 1 uL de Ladder
- Cargar las muestras en los pocillos restantes
- Cerrar la cámara de electroforesis
- Conectar la fuente de poder y los cables de ánodo y cátodo
- Programar a 75 Voltios durante 60 minutos
- Empezar la corrida electroforética